

**DNA: DNA-HYBRIDISIERUNG ZUM NACHWEIS  
MELANOMSPEZIFISCHER NUKLEINSÄURESEQUENZEN**

**Brigitte Forster**

---

**1983**

---



Aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. O. Braun-Falco

DNA:DNA-HYBRIDISIERUNGEN ZUM NACHWEIS MELANOMSPEZIFISCHER  
NUKLEINSÄURESEQUENZEN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin  
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Brigitte Forster  
aus  
Immenstadt

München 1983

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. B.-R. Balda

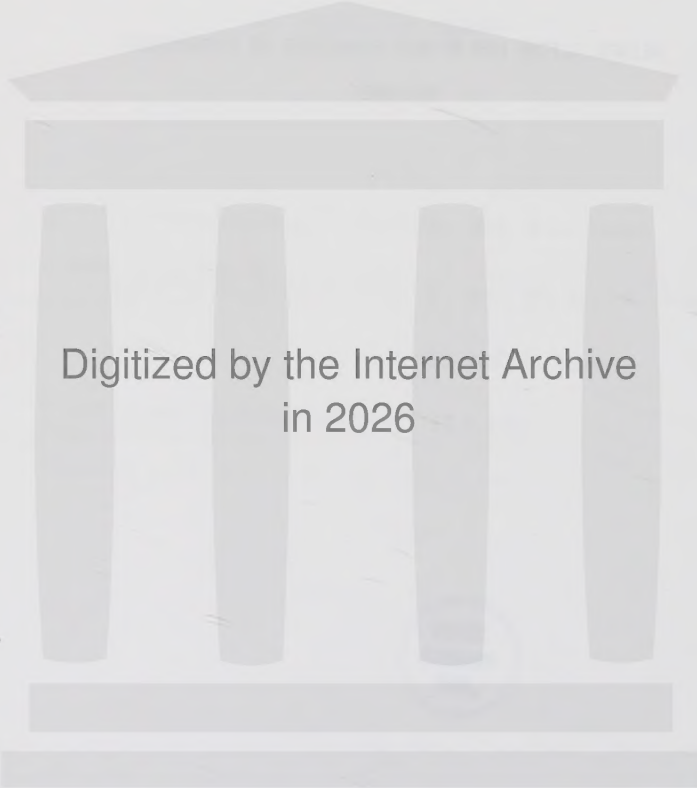
Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. h.c. O. Braun-Falco

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 13.1.1983



MEINEN ELTERN UND MEINER SCHWESTER IN DANKBARKEIT  
GEWIDMET



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

## Inhaltsverzeichnis

|                                                                                   | Seite |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 1. Einleitung                                                                     | 6     |
| 1.1 Viren als Ursache von Tumoren                                                 | 6     |
| 1.1.1 Die Onkogenhypothese                                                        | 7     |
| 1.1.2 Die Provirushypothese                                                       | 8     |
| 1.2 Morphologische (elektronenmikroskopische)<br>Klassifikation von RNA-Tumoviren | 10    |
| 1.3 Aufbau der RNA-Tumoviren                                                      | 11    |
| 1.4 Onkorna-Viren und menschliche Tumoren                                         | 12    |
| 2. Onkorna-Viren und maligne Melanome                                             | 15    |
| 2.1 Das amelanotische Hamstermelanom A Me13                                       | 15    |
| 2.2 Das melanotische Mäusemelanom B16                                             | 17    |
| 2.3 Menschliche maligne Melanome                                                  | 17    |
| 3. Problemstellung                                                                | 20    |
| 4. Material und Methoden                                                          | 21    |
| 4.1 DNA-Extraktion                                                                | 22    |
| 4.2 Quantitative DNA-Bestimmung                                                   | 23    |
| 4.3 Qualitative DNA-Bestimmung und Erstellung<br>einer Eichkurve                  | 24    |
| 4.4 Hybridisierung DNA:DNA                                                        | 24    |
| 4.5 Hydroxylapatit-Säulenchromatographie                                          | 25    |
| 4.6 Schmelzkurve                                                                  | 27    |

|     |                                                                                 |    |
|-----|---------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.  | Ergebnisse                                                                      | 28 |
| 5.1 | Qualitative DNA-Bestimmung und Erstellung einer Eichkurve mit Kalbsthymus-DNA   | 28 |
| 5.2 | Quantitative DNA-Bestimmung (Messungen im Beckman DB-Spektralphotometer)        | 30 |
| 5.3 | Qualitative Nukleinsäurebestimmung mit Hamster-, Spalthaut- und Kalbsthymus-DNA | 31 |
| 5.4 | Schmelzkurven mit Hamster-, Naevus- und Maus-DNA                                | 32 |
| 5.5 | Hybridisierungsergebnisse                                                       | 34 |
| 6.  | Diskussion                                                                      | 46 |
| 7.  | Zusammenfassung                                                                 | 54 |
| 8.  | Literaturverzeichnis                                                            | 55 |

Danksagung

Lebenslauf



## 1. Einleitung

### 1.1 Viren als Ursache von Tumoren

1908 gelang Ellerman und Bang die Übertragung der Hühnererythroleukämie durch zellfreie Blut- und Organfiltrate (28). 1910 isolierte Rous ein Virus, das für die Auslösung von Hühnerspindelzellsarkomen verantwortlich war (48, 49). Obwohl durch diese grundlegenden Versuche die Virusgenese tierischer Tumoren wahrscheinlich gemacht wurde, setzte sich dieser Gedanke erst Jahrzehnte später durch, nachdem auch Bittner Mäuse-Brustkrebs zellfrei übertragen hatte (21).

Viren werden je nach Aufbau ihrer Nukleinsäure aus DNA (Desoxyribonukleinsäure) oder RNA (Ribonukleinsäure) als DNA- bzw. RNA-Viren bezeichnet.

Das genetische Material der DNA-Viren kann sowohl in die chromosomale DNA der Wirtszelle integriert als auch episomal gelagert werden. In beiden Fällen ist durch Realisation dieser externen genetischen Information die Transformation der Wirtszelle möglich (41).

DNA-Viren mit nachgewiesenem onkogenen Potential bei Tieren sind Herpesviren (lymphoproliferative Erkrankungen bei Affen), Adenoviren (Hamstertumoren) und Papovaviren (Nagertumoren) (16).

Bei RNA-Tumoviren (onkogene-RNA-Viren = Onkorna-Viren, auch Leukoviren oder Retroviren) ist die Situation komplizierter. Da ihr Genom aus RNA besteht, muß vor der Integration eine Umwandlung der RNA in DNA erfolgen. Zu diesem Zweck besitzen RNA-Tumoviren ein Enzym, die reverse Transkriptase, das an RNA als Matriz virusspezifische, komplementäre DNA synthetisiert. 1970 gelang es Temin, experimentell in Rous-Sarkom-Viren die reverse Transkriptase nachzuweisen (56). Baltimore machte unabhängig von Temin ähnliche Beobachtungen in Mäuseleukämieviren (10).

1971 entwickelten Schlom und Spiegelman den sog. simultaneous detection test zum Nachweis der reversen Transkriptase und einer hochmolekularen 70S-RNA (siehe 2.1) in malignen Tumoren (50).

RNA-Tumoviren können deshalb unter bestimmten Umständen die Zielzelle

transformieren. In der Regel ist damit keine Virusproduktion verbunden, doch ist dies möglich. Die Integration ins Wirtsgenom bedeutet nicht zugleich malignes Wachstum, da in den meisten Zellen die neue Information durch zell-eigene Kontrollmechanismen unterdrückt wird.

Als Prototyp onkogener RNA-Viren werden Rous-Sarkom-Viren angesehen.

Viele Details der viralen Genomintegration in die Wirtszelle und des Transformationsprozesses sind bis heute ungeklärt. Es wurden Hypothesen entwickelt, die das Vorhandensein viraler Information zu erklären versuchen. Die Weitergabe des onkogenen Potentials kann sich vertikal, d.h. von der Parental- auf die Filialgeneration oder horizontal, d.h. infektiösähnlich vollziehen.

### 1.1.1 Die Onkogenhypothese

Die Onkogenhypothese wurde von Huebner und Todaro (40) aufgestellt und besagt, daß Virusgene in mehreren Kopien in jeder Soma- und Keimzelle eines jeden Individuums vorhanden sind. Sie werden gemäß den Mendelschen Gesetzen an die Nachkommenschaft weitergegeben (vertikale Transmission). Diese Gene sind latent vorhanden und inaktiv; sie rufen keine Krankheitssymptome hervor, da sie unter zellulärer Kontrolle stehen. Erst die Dereprimierung der viralen Information entweder spontan oder infolge einer Zellstimulation kann zur Expression führen (34).

Exogene, eine Transformation auslösende Faktoren sind beispielsweise Röntgenstrahlen, chemische Kanzerogene und Mutagene sowie Viren.

Endogene Ursachen können hormonelle Einflüsse, Änderung der Immunitätslage, Graft-versus-host Reaktionen etc. sein (51, 57).

RNA-Tumurviren, die in Normalzellen nachweisbar sind, werden als endogene Viren bezeichnet. Über ihre genauen Funktionen liegen keine fundierten Kenntnisse vor. Nach Todaro sind jedoch folgende denkbar (57):

1. Diese Gene spielen in der Embryonalzeit während Differenzierung und Entwicklung eine physiologische Rolle.
2. Endogene Viren schützen die Zelle vor einer Infektion mit verwandten, aber wesentlich virulenteren Viren.

3. Transformation führt zur rascheren Produktion endogener Viren, die ihrerseits durch neue Zellmembranantigene das Immunsystem schneller in Bereitschaft setzen.
4. Endogene Viren können genetische Information zwischen den Keimzellen verschiedener Spezies unter natürlichen Bedingungen übertragen. Diesen Vorgängen kommt möglicherweise eine Bedeutung im Rahmen der Evolution zu.

### 1.1.2 Die Provirushypothese

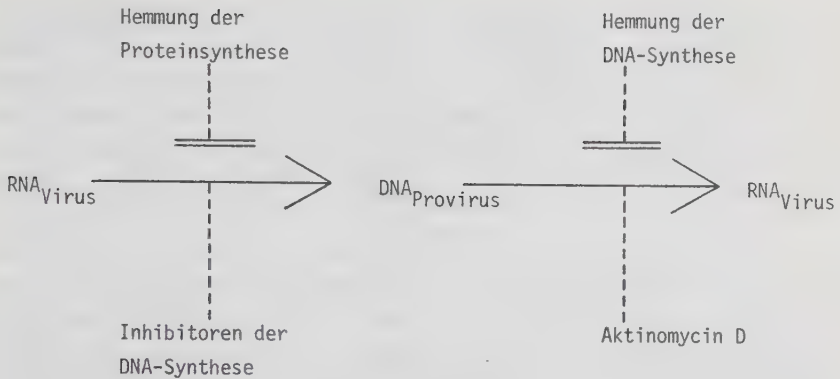
Die Provirushypothese wurde zuerst von Temin (52) formuliert. Sie geht davon aus, daß über den Weg einer Infektion Tumoviren in die Zelle aufgenommen werden. Die virale RNA wird mit Hilfe der reversen Transkriptase in eine doppelsträngige, komplementäre DNA transkribiert. Die replikative Intermediärform der RNA-Tumoviren heißt DNA-Provirus; dieses wird in das Wirtsgenom integriert.

Die Replikation eines klassischen RNA-Tumovirus führt nicht zum Tod der infizierten Zelle. Die Wirtszelle teilt sich und gibt die virale Information an die Tochterzelle weiter. Die virale Replikation nach Infektion einer Zelle mit dem Informationsfluß  $\text{RNA}_{\text{Virus}} \rightarrow \text{DNA}_{\text{Provirus}} \rightarrow \text{RNA}_{\text{Virus}}$  bietet die Möglichkeit für eine beständige und latente Infektion.

Horizontale Transmission spielt nach Todaro (57) eine Rolle bei Katzen- und Rinderleukämien. So ist bis heute kein Fall bekannt, daß isoliert aufgewachsene Hauskatzen je an Leukämie erkrankten.

Ein indirekter, experimenteller Beweis für die Provirushypothese wurde dadurch erbracht, daß Inhibitoren der DNA-Synthese die Entstehung eines DNA-Provirus und damit die Infektion einer Zelle durch ein RNA-Tumovirus verhinderten. Die Hemmung der Proteinsynthese war in dieser Phase des Experiments ohne Wirkung.

Aktinomycin D, ein Inhibitor der DNA-abhängigen RNA-Synthese, hemmte die Virusvermehrung einer bereits infizierten, d.h. die replikative Intermediärform besitzende Zelle, wohingegen die DNA-Synthese nicht beeinträchtigt wurde. Das Vorhandensein eines DNA-Provirus war damit indirekt bewiesen (54).



(nach Temin (54))

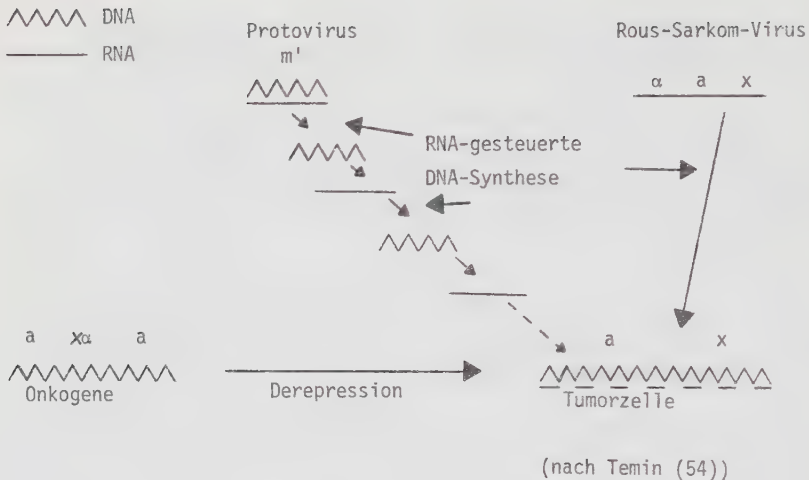
### 1.1.3 Die Protovirushypothese

RNA-gesteuerte DNA-Synthese wird nicht nur von der Provirus-, sondern auch von der Protovirushypothese gefordert. Sie stellt eine Weiterentwicklung der Provirushypothese dar und beinhaltet auch Elemente der Onkogenhypothese (33, 53, 55).

Kernsatz ist, daß im Rahmen normaler zellulärer Prozesse, wie Embryogenese, Antikörperbildung und Langzeitgedächtnis, m-RNA in DNA transkribiert, von Zelle zu Zelle transportiert und ins Genom eingebaut wird. Der Informationsfluß  $DNA \rightarrow RNA \rightarrow DNA$  wäre somit ein natürlicher, biologischer Vorgang mit Hilfe einer physiologischen reversen Transkriptase (55).

So kann eine ursprünglich vorhandene Information modifiziert werden; dabei ist eine maligne Transformation grundsätzlich möglich. Bei der Übersetzung der DNA in m-RNA im Rahmen der Proteinsynthese könnten RNA-Bruchstücke mit onkogener Potenz ("para-processing") entstehen (33).

Zusammenfassend hat Temin folgende schematische Darstellung entwickelt (54):



## 1.2 Morphologische (elektronenmikroskopische) Klassifikation von RNA-Tumoviren

RNA-Tumoviren werden in sechs Untergruppen (A - F) gegliedert. Diese Einteilung beruht auf den morphologischen Kriterien, die Bernhard 1964 bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen verschiedener Mäusetumoviren aufstellte (15, 41).

Typ A-Partikel besitzen einen Durchmesser von 60 nm. Sie existieren in zwei Formen: intrazytoplasmatisch und intrazisternal. Beide Typen haben eine doppelte Hülle und einen elektronendurchlässigen Kern. Die Rolle der intrazisternalen Typ A-Partikel ist unbekannt, wohingegen die intrazytoplasmatischen als Vorläufer zu Typ B-Partikel angesehen werden (15, 25, 26, 30).

Typ B-Partikel, deren Prototyp das MMTV (mouse mammary tumor virus) verkörpert, besitzen eine Hülle aus Membrangrundstruktur. Diese stammt von der Zelle und wird beim Ausschleusungsvorgang (budding) um den vorgefertigten, vollständigen Partikelkern gestülpt. Typ B-Partikel liegen extrazellulär. Die reifen Formen haben exzentrische Nukleioide (Kerne) und tragen an ihrer äußeren Oberfläche ausgeprägte, lange Peplomeren (Spikes), die virusspezifische Glykoproteine sind (15, 25, 26, 30).

Typ C-Partikel besitzen im Zytoplasma der Wirtszelle keine morphologisch identifizierbare Gestalt. Sie stülpen sich mit einem unvollständigen, halbmondförmigen Nukleoid an der Zellmembran aus. Die extrazellulären Formen haben einen zentralen Kern. Sie tragen jedoch keine Spikes. Endogene Viren gelten als Typ C-Partikel, z.B. das Mäuseleukämievirus (MuLV) (15, 25, 26, 30).

Das Mason-Pfizer monkey virus (MPMV), das aus einem Mammakarzinom eines weiblichen Rhesusaffen isoliert wurde, wird als typischer Vertreter der Typ D-Partikel angesehen. Die intrazellulären Typ D-Partikel haben eine ringförmige Gestalt und einen Durchmesser von 60 - 90 nm. Sie liegen nahe der Zellmembran und stülpen sich mit einem vollständigen Nukleoid aus. Die extrazellulären, reifen Formen sind 100 - 120 nm groß und besitzen einen elektronendichten, zentralen, tubulären Kern. Die Hüllmembran ist unregelmäßig gestaltet. Sie trägt keine Spikes, sondern knopfförmige Ausbuchtungen (15, 25, 26, 30). Typ D-Partikel wurden in menschlichen HeLa-Zellen gefunden (32).

### 1.3 Aufbau der RNA-Tumoviren

Reife RNA-Viren sind sphärische Partikel mit einem Durchmesser von 90 - 120 nm (15, 31). Sie bestehen zu 60 - 70 % aus Protein, zu 20 - 30 % aus Lipiden, zu 2 % aus Kohlenhydraten und nur zu 1 % aus RNA (11). Der elektronendichte, zentrale, 30 - 40 nm große Kern enthält die virale RNA, die reverse Transkriptase und Strukturproteine. Die Hülle aus Membrangrundstruktur entsteht beim Ausschleusen des vorgefertigten Kerns aus der Zelle.

Das Genom der Onkorna-Viren besteht aus einer hochmolekularen, einsträngigen RNA, die im Bereich von 70S sedimentiert. Der 70S-Einzelstrang setzt sich aus zwei identischen 35S-Untereinheiten zusammen, die ein Molekulargewicht von je  $3,5 \times 10^6$  Dalton haben (11, 31, 59).

Onkorna-Viren zeichnen sich durch eine charakteristische Dichte von 1,16 bis  $1,19 \text{ g/cm}^3$  im Saccharosegradienten aus.

Bisher sind zwei virale Proteine näher untersucht worden, nämlich eines mit einem Molekulargewicht von 30000 (p 30), das sich im Kern befin-

det und die größte antigene Potenz besitzt (31), ein weiteres mit einem Molekulargewicht von 70000 (gp 70), ein virusspezifisches Glykoprotein an der äußeren Membranoberfläche, das mit spezifischen Oberflächenrezeptoren der Zielzelle reagiert (11, 31).

Die genetische Struktur der RNA-Tumoviren wurde an Hühnersarkomviren aufgeklärt (11). Sie ist aus den Genen "gag, pol, env, src" aufgebaut.

Das Gen "gag" kodiert für ein hochmolekulares Protein ("precursor"), das proteolytisch in verschiedene Strukturproteine (core-Komponenten) gespalten wird. "Pol" ist der genetische Code für ein Precursormolekül, das nach Spaltung und Zusammenlagerung die reverse Transkriptase bildet. Das Produkt des Genorts "env" ist das Glykoprotein gp 70. Bei Verlust dieses Gens sind die Viren zur Neuinfektion ohne Helfervirus nicht mehr fähig. Das Cenvprodukt von "src" ist nicht bekannt. Es besteht jedoch kein Zweifel, daß "src" sarkomspezifisch und für die Transformation von Fibroblasten verantwortlich ist. Geht diese Sequenz während der Replikation verloren, ist das RNA-Tumovirus nicht mehr in der Lage, Fibroblasten zu transformieren und Sarkome hervorzurufen (Übersicht bei 11, 57).

Neuere Untersuchungen lassen den Schluß zu, daß kein spezifischer Sequenzaufbau vorliegt, sondern daß es sich um eine spezifische Insertion in die chromosomale DNA handelt (58).

#### 1.4 Onkorna-Viren und menschliche Tumoren

Obwohl aus zahlreichen menschlichen Geweben RNA-Tumoviren isoliert werden konnten (1, 12, 24), ist ihre kausale Bedeutung für die Genese menschlicher Tumoren umstritten. Auf die spezielle Problematik im Hinblick auf menschliche Malignome wird später eingegangen. Im allgemeinen ist auch ihr Nachweis im Vergleich zum tierischen Modellsystem sehr schwierig. Gallo stellte mehrere Überlegungen zur Erklärung dieser Tatsache an (31):

1. Die große Anzahl von Viren, die in vielen tierischen Zellen gefunden wird, ist für die Transformation nicht notwendig. Wenige, temporär sich replizierende Viren sind ausreichend.
2. Menschliche Zellen besitzen die virale Information, ihre Replikation ist jedoch minimal.

3. Tierische Zellen, in denen Onkorna-Viren leicht und in großer Zahl nachweisbar sind, besitzen noch geringe Mengen anderer RNA-Tumorvirustypen, deren Existenz jedoch verschleiert ist.
4. Provirusfragmente genügen zur Transformation.
5. Die virale Information setzt das maligne Wachstum lediglich in Gang. Der Verlust dieses Virus nach induzierter Transformation ist für die entstandene Tumorzelle ohne Bedeutung.

Die Erforschung der Virusätiologie menschlicher Tumoren ist erschwert, da die meisten Malignome vorbehandelt sind und viele, nicht spezifische Läsionen zeigen. Operationsmaterial ist für Forschungszwecke weniger gut geeignet als leicht induzierbare, schnell wachsende Tumoren im Tierversuch. Nicht-onkogene Viren, die zufällig in der Tumorzelle vorhanden sind, erschweren die Untersuchungen (15).

Insbesondere haben sich in dieser Hinsicht die Henle-Kochschen Postulate (45, 62)

- der Erreger soll bei einer Infektionskrankheit stets zu finden sein
  - der Infektionserreger soll außerhalb des erkrankten Organismus züchtbar sein
  - die Infektion mit dem gezüchteten Erreger soll zu einem typischen Krankheitsbild führen und der Erreger soll wieder isolierbar sein
  - der Nachweis spezifischer Antikörper ist zu führen
- als wenig hilfreich erwiesen. Sie waren nützlich, um unkritischen Spekulationen über infektiöse Agenzien Einhalt zu gebieten und haben zur Erklärung bakterieller Infektionen bis heute ihre Gültigkeit behalten.

Die Tierexperimente zum Nachweis onkogener Viren wurden deshalb mit großer Sorgfalt durchgeführt und besitzen somit einen erheblichen Beweiswert. Sowohl aus ethischen Gründen als auch auf Grund der oben erwähnten Ausführungen können die Henle-Kochschen Postulate beim Menschen jedoch keine Gültigkeit haben.

Zur Nomenklatur ist anzumerken, daß von menschlichen Tumoviren nur dann gesprochen werden darf, wenn sie wie im Tiersystem isoliert und morphologisch wie biochemisch und biophysikalisch charakterisiert worden sind.

Folgende Merkmale der RNA-Tumoviren müssen nachweisbar sein:

- eine hochmolekulare, einsträngige 70S-RNA
- die reverse Transkriptase

- eine Dichte von 1,16 bis 1,19 g/cm<sup>3</sup> im Saccharosegradienten

Solange dies nicht der Fall und lediglich der morphologische oder ein anderer, indirekter Nachweis erbracht worden ist, sollte besser von virusartigen Partikeln gesprochen werden (Übersicht bei 4, 10, 50, 56).

## 2. Onkorna-Viren und maligne Melanome

Vor der Untersuchung von menschlichen malignen Melanomen wurde zunächst an zwei tierischen Modellsystemen gearbeitet, die für das maligne Melanom als repräsentativ angesehen werden können. Es handelt sich hierbei um das amelanotische Hamstermelanom A Me13 und um das melanotische Mäusemelanom B16, beides metastasierende Tumoren (3, 9, 37).

### 2.1 Das amelanotische Hamstermelanom A Me13

Im Hamstermelanom A Me13 wurden bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen virusartige Partikel mit radspeichenartiger Struktur gefunden (3, 9, 63). Diese besitzen eine sphärische oder leicht ovale Gestalt, einen Durchmesser von ungefähr 100 nm und einen 50 nm großen, elektronendichten Kern. Sie liegen in den meisten Fällen in den Zisternen des rauen endoplasmatischen Retikulums.

Entsprechend den Versuchen von Ellerman, Bang und Rous wurde die zellfreie Übertragung von Melanomen mit diesen virusartigen Partikeln durchgeführt, um die Wahrscheinlichkeit einer Virusätiologie dieser Tumoren untermauern zu können (18).

Ein Charakteristikum onkogener Viren ist das Replikationsvermögen in zellfrei induzierten Tumoren. Zu diesem Zweck wurden die virusartigen Partikel des Hamstermelanoms A Me13 in einer subzellularen Fraktion, in der die reverse Transkriptase ihr Maximum besitzt, angereichert. Die subkutane Injektion dieser Präparation ließ an der Inokulationsstelle einen Tumor entstehen. Bei neugeborenen Tieren lag die Induktionsrate mit einer Dosis von mindestens 10 mg Protein bei 100 %. Eine Menge von 5 mg führte nur in 20 % der Fälle zur Entstehung eines Malignoms, während 1 mg für die Auslösung von Tumorstadium nicht mehr ausreichend war. Zur Erzeugung eines Melanoms waren ungefähr  $10^8$  virusartige Partikel notwendig (18).

Die zellfrei übertragenen Tumoren wurden ebenfalls elektronenmikroskopisch untersucht. Die charakteristischen virusartigen Partikel waren erneut nachweisbar (18).

Ähnliche Versuche von Epstein et al. (29) führten zum gleichen Ergebnis. Epstein et al. gewannen aus pigmentierten Hamstermelanomen ein zellfreies Ultrafiltrat und injizierten es jungen Hamstern intradermal, subkutan und intraperitoneal. In den entstandenen Tumoren fanden sie Partikel, die Bernhards Typ C-Viren ähnelten. Vier verschiedene Tumoren wurden nach der 20. Generation aseptisch entfernt, homogenisiert, filtriert und erneut jungen Hamstern intradermal injiziert. Innerhalb von drei bis sechs Wochen waren Melanome sichtbar.

Für den Beweis einer Virusätiologie des amelanotischen Hamstermelanoms A Mel3 genügen die Ergebnisse der Elektronenmikroskopie und der zellfreien Übertragung nicht. Die virusartigen Partikel müssen die charakteristischen biochemischen Eigenschaften der RNA-Tumoviren besitzen (siehe 1.4).

Die reverse Transkriptase und die hochmolekulare 70S-RNA können in einem Testsystem, dem sog. simultaneous detection test, nachgewiesen werden. Dieser wurde von Schlom und Spiegelman (50) für die Forschung an menschlichen, malignen Tumoren entwickelt. Zwei wichtige Kennzeichen der Onkoviren werden somit in einem Arbeitsgang aufgezeigt. Dies erhöht selbstverständlich die Sicherheit der Ergebnisinterpretation.

Der Nachweis der reversen Transkriptase und einer 70S-RNA mit Hilfe des simultaneous detection test untermauerte die Annahme einer Virusätiologie des Hamstermelanoms (7). Versuche mit Mutanten zeigten, daß nur beide Eigenschaften zusammen die maligne Transformation verursachen können (18).

Proflavin und Ethidiumbromid, die die reverse Transkriptase in vivo und in vitro hemmen, verhinderten die zellfreie Tumorübertragung und beeinträchtigten das Wachstum bereits manifester Tumoren (18). Ein früheres Experiment postulierte bereits die spezifische Hemmwirkung von Proflavin auf den Nukleinsäure- und Proteinstoffwechsel des Hamstermelanoms, die somit ein spezifisches Tumorzeichen sein könnte (5, 17).

Diese Versuche sind ein indirekter Beweis für das Vorhandensein der reversen Transkriptase im Hamstermelanom A Mel3.

## 2.2 Das melanotische Mäusemelanom B16

Elektronenmikroskopisch wurden virusartige Partikel im melanotischen Mäusemelanom B16 gefunden (Balda, unveröffentlichte Versuche). Biochemische Untersuchungen bestätigten die Entdeckung.

Im simultaneous detection test wurden eine partikelgebundene, hochmolekulare 70S-RNA und die reverse Transkriptase nachgewiesen (36, 37). Mit Hilfe dieser Partikel synthetisierte ( $^3\text{H}$ )cDNA hybridisiert mit der RNA von Tumorzellen, während die Hybridisierung mit RNA aus Normalzellen negativ verlief. Diese Ergebnisse führten zur Annahme virusspezifischer Sequenzen in diesen Mäusemelanomen (36).

## 2.3 Menschliche maligne Melanome

Die vielversprechenden Ergebnisse regten zu Untersuchungen verschiedener menschlicher Tumoren an.

Spiegelman et al. (1, 12) konnten zeigen, daß 79 % bösartiger Brusttumoren und 95 % der Leukozyten von Leukämiepatienten Partikel enthielten, die die für RNA-Tumoviren geforderten Bedingungen erfüllten (siehe 1.4).

Diese intrazytoplasmatischen Partikel enthielten in ihrer Nukleinsäure Sequenzen, die zur RNA analoger, animaler Onkorna-Viren homolog waren (2, 39).

Reverse Transkriptase-Aktivität bedeutet, daß die mit Hilfe dieser Partikel synthetisierte cDNA mit der Matrizen-RNA rückhybridisiert werden kann. ( $^3\text{H}$ )cDNA wurde mit der Partikel-RNA inkubiert und das Reaktionsprodukt anschließend mit einer  $\text{Cs}_2\text{SO}_4$ -Lösung zentrifugiert. Die meiste Radioaktivität wurde im  $\text{Cs}_2\text{SO}_4$ -Dichtegradienten in einem Bereich gefunden, der für RNA charakteristisch ist (1, 12).

Bernhard et al. (13) versuchten vergeblich, in Kulturzellen nicht-leukämischen, menschlichen Gewebes die Synthese endogener Typ C-Viren anzuregen. Es konnte keine reverse Transkriptase-Aktivität nachgewiesen werden. Bern-

hard kam daher zu dem Schluß, daß im gesunden Gewebe keine virusspezifischen Partikel vorhanden sind.

Reverse Transkriptase und eine 70S-RNA wurden in Malignomen des Gastrointestinaltraktes und der Lunge, nicht aber in Zellen von Normalgewebe (24) gefunden.

Melanome, die auf Grund ihres sehr bösartigen und progressiven Wachstums und ihrer frühzeitigen Metastasierung zu den gefürchtetsten Tumoren zählen, wurden zum Gegenstand intensiver Forschung. Die virale Genese kann auf Grund zahlreicher Experimente als wahrscheinlich gelten (6, 36).

Bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen menschlicher Melanommetastasen (20) und von Primärtumoren wurden Partikel gefunden, die denen des Hamstermelanoms sehr ähnlich sind (8, 20). Ihre Klassifikation ist aber noch nicht endgültig möglich, da bisher eine Züchtung in vitro nicht gelang.

Biochemische Versuche erhärteten die Annahme einer Virusgenese (6, 8):

- die Messung der spezifischen RNA-abhängigen DNA-Polymerase-Aktivität in menschlichen Melanomen entsprach derjenigen des Hamstermelanoms A Mel3
- reverse Transkriptase-Aktivität wurde in Hirnmetastasen maligner Melanome gefunden
- die Hemmung der reversen Transkriptase durch Aktinomycin D und Ethidiumbromid war ein indirekter Beweis für das Vorhandensein dieses Enzyms
- im simultaneous detection test wurden die reverse Transkriptase und die 70S-RNA nachgewiesen (36).

Parsons et al. (46) konnten allerdings die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Balda bestätigen: Mit Uridin markierte Partikel in den Zellen einer menschlichen Melanomkultur wiesen die charakteristischen Eigenschaften von Onkorna-Viren auf; desgleichen sprachen simultaneous detection test und "velocity sedimentation" (47) mit Material aus menschlichen Melanomzellen und Kontrollbiopsien für die Richtigkeit der Erstuntersuchungen.

Für Versuche mit menschlichen Melanomen haben sich Mäusemelanome vom Typ B16 ebenfalls als geeignetes Modell erwiesen, da sie nicht nur große morphologische Ähnlichkeit zeigen, sondern auch leicht induzierbar sind und rasch wachsen.

Die molekulare Hybridisierung von Mäusemelanom-( $^3\text{H}$ )cDNA (Produkt der reversen Transkriptase mit der viralen RNA aus Mäusemelanomgewebe als Vorlage) mit viraler, zytoplasmatischer RNA aus menschlichen- und Hamstermelanomen erbrachte den Nachweis von virusähnlichen Sequenzen in diesen Nukleinsäuren (35, 36, 37).

Folgende Hybridisierungsergebnisse sprechen für Sequenzhomologien sowohl in der DNA verschiedener tierischer Melanome als auch zwischen menschlichen und tierischen Melanomen:

|                          |                                       |         |
|--------------------------|---------------------------------------|---------|
| Mäusemelanom-RNA         | : Mäusemelanom-( $^3\text{H}$ )cDNA : | 10,5 %  |
| Hamstermelanom-RNA       | : Mäusemelanom-( $^3\text{H}$ )cDNA : | 7,2 %   |
| Menschliche Melanom-RNA: | Mäusemelanom-( $^3\text{H}$ )cDNA :   | 5,8 %   |
| AMV-70S-RNA              | : Mäusemelanom-( $^3\text{H}$ )cDNA : | - 0,3 % |

Zur Kontrolle wurden folgende Versuche durchgeführt:

1. Die Hybridisierung B16cDNA:AMV-70S-RNA verlief negativ.
2. Das Rückhybridisierungsprodukt B16cDNA:Matrizen-RNA sedimentierte im  $\text{Cs}_2\text{SO}_4$ -Dichtegradienten im Bereich der charakteristischen Bande.

### 3. Problemstellung

Zahlreiche Experimente berechtigen die Annahme einer Virusätiologie tierischer Melanome (siehe 2.1, 2.2).

In früheren Versuchen (35, 36, 37) wurde Mäusemelanom-( $^3\text{H}$ )cDNA mit viraler, zytoplasmatischer RNA menschlicher und tierischer Melanome hybridisiert. Die positiven Ergebnisse im Hybridisierungsausmaß weisen auf Homologien zwischen diesen Nukleinsäuren hin (siehe 2.3).

Der Frage nach gleichartigen Gensequenzen und damit einer viralen Genese des menschlichen malignen Melanoms sind wir in den nachfolgend dargestellten Experimenten nachgegangen. Wir untersuchten jedoch menschliches Normal- und Tumorgewebe nicht mit RNA-DNA-(siehe oben), sondern mit DNA:DNA-Hybridisierungen, die eine größere Spezifität und damit einen höheren Aussagewert besitzen.

#### 4. Material und Methoden

Menschliche Melanome, Naevi und Spalthaut wurden unmittelbar nach operativer Entfernung bis zur weiteren Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren.

Hamstertumoren sowie Normalgewebe aus Hamster- und Mäuselebern entstammten der eigenen Zucht, Mäusemelanome von der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, Neuherberg. Bis zur Aufarbeitung wurde auch dieses Material bei  $-20^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren.

##### Material:

Proteinase K (aus Pilzen, chromatographisch gereinigt, lyophilisiert, 20 m Anson-E/mg): Firma Merck, Darmstadt

RNase A (aus Rinderpankreas, Trockenpulver-100 mg, 100 g/ml), RNase  $T_1$  (aus *Aspergillus oryzae*, suspension, 500000 U/ml), nicht-radioaktive Desoxyribonukleoside: Boehringer, Mannheim

Kalbsthymus-DNA: Serva, Heidelberg

Rotiszint 22 (aus PPO, POPOP Triton x 100 Toluol): Firma C. Roth KG, Karlsruhe

Radioaktives Material ((Methyl- $^3\text{H}$ )Thymidine-Triphosphate, 43 Ci/mmol-5 ml): Firma Amersham Buchler, Braunschweig

##### Geräte:

Spektralphotometer: Beckman DB, Fullerton, California

Potentiometerschreiber linear/logarithmisch: Servogor S

Ultrazentrifuge: Sorvall-RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge, Du Pont De Nemours

Homogenisator: Silverson-Machines LTD, Waterside Chesham, Bucks. Laboratory-Mixer Emulsifier

Flüssigkeitsszintillationszähler: Packard, Tri-Carb, Model 3380

Die Zählflasche für  $^3\text{H}$ -Thymidin beträgt 48 %.

Ultraschallzerkleinerer: MSE 100 Watt Ultrasonic Disintegrator (18 Kc/s-24Kc/s), Measuring & Scientific Equipment LTD, London, England.

##### Puffer und Lösungen:

1. TNE-Puffer pH 8,3: 0,01 M TRIS (1,21 g/l)  
0,15 M NaCl (8,77 g/l)

- 0,01 M EDTA (3,72 g/l)  
(pH-Einstellung mit 1 n HCl bzw. NaOH)
2. 0,1 x SSC : 0,15 M NaCl (8,77 g/l)  
0,015 M NaCitrat (4,41 g/l)  
(Verdünnung der Stammlösung im Verhältnis 1:10)
3. 1 M NaPO<sub>4</sub> 1:1 : 1 Mol Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> MG 177,99  
1 Mol NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> MG 137,99
4. Puffer 1 : 0,12 M NaPO<sub>4</sub> + 0,4 % SDS
5. Puffer 3 : 0,4 M NaPO<sub>4</sub> + 0,4 % SDS
6. Reagenz zur qualitativen DNA-Bestimmung:  
100 ml Reagenz : 3 g Diphenylamin  
2,75 ml 96 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
0,5 ml Acetaldehyd
- Aufnahme des Diphenylamins in ca. 40 ml Eisessig, Zugabe der restlichen Reagenzien und Auffüllung mit Eisessig auf 100 ml.
7. Phenol-Kresol : 250 ml dest. Phenol  
36 ml dest. Kresol(meta-) MG 108,14  
1,058 g 8-Hydroxychinolin MG 145,16  
mit TRIS-Puffer pH 8,3 versetzen, mischen, absaugen (2x)  
Zugabe von 0,01 M TRIS  
Aufbewahrung bei 4° C im Dunkeln

Die übrigen Substanzen wurden, wenn nicht anders angegeben, durch die Firma Merck AG, Darmstadt oder Serva, Heidelberg bezogen.

#### 4.1 DNA-Extraktion

Das Gewebe wurde kleingeschnitten, gewogen und in TNE-Puffer pH 8,3 (Gewicht (g):Volumen(ml) = 1:3) aufgenommen.

Folgende Arbeitsschritte führten zur Extraktion der DNA:

- Homogenisation (Silverson-Machines) des Gewebes 2 x 30'' (bzw. bei Naevus und Spalthaut: 4 x 30'') bei langsamer Geschwindigkeit. Dabei wurde das Material zur Hemmung der freigesetzten hydrolysierenden Enzyme eisgekühlt.
- Abzentrifugation des Homogenats bei 5000 rpm, 20' bei Raumtemperatur, Dekantieren des Überstandes und Aufnahme des Rückstandes aus Kernen zum Zell-

aufschluß in 100 ml TNE-Puffer pH 8,3 + 4 ml 10 % SDS (Endkonzentration 1 M, MG 140,5).

- Zugabe von Proteinase K (100 µg/ml) nach einstündigem Rühren.
- Nach drei Stunden Rühren Enteiweißung mit gesättigtem Phenol-Kresol (zwei bis drei Stunden schütteln) und anschließend Phasentrennung bei 8000 rpm, 15', Raumtemperatur.
- Zweimalige Chloroformextraktion zur Entfernung verbliebener Phenolreste, Trennung der Phasen und Fällung der wäßrigen Phase, die die DNA enthält, mit dem doppelten Volumen eisgekühlten, absoluten Äthanol (vier Stunden, - 20° C).
- Je nach Menge Herausdrehen der DNA mit einem Glasstab oder Abzentrifugation der Fällung bei 8000 rpm, 15', - 20° C, Trocknung der DNA und Aufnahme in 0,1 x SSC pH 7,0.
- RNase-Verdauung mit RNase A und RNase T<sub>1</sub> (drei Stunden, 37° C) zur Zerstörung verbliebener RNA-Reste, anschließend erneute Enteiweißung, Fällung und Aufnahme der von Eiweiß und RNA gereinigten DNA in 0,1 x SSC.

#### 4.2 Quantitative DNA-Bestimmung

- Eichung des Beckman DB-Spektralphotometers bei 320 nm; bei dieser Wellenlänge besitzt die DNA keine Absorption, und mögliche Verunreinigungen werden eliminiert.
- Messung von 0,3 ml gelöster DNA in einer Mikroküvette gegen 0,1 x SSC als Referenz bei den Wellenlängen 280 und 260 nm.
- Aufzeichnung des Spektrums mit Hilfe des Servogor S Potentiometerschreibers.
- Bestimmung des Verhältnisses  $\frac{A_{260}}{A_{280}}$ , das ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäure darstellt und zwischen 1,83 - 1,9 liegen sollte. Bei einem Wert > 1,9 ist noch RNA vorhanden und damit wäre eine nochmalige RNA-Verdauung notwendig. Bei einem Verhältnis < 1,83 ist noch reichlich Protein enthalten.

Die Spektralphotometrie dient der quantitativen Bestimmung der DNA, die bei einer Wellenlänge von 260 nm in Abhängigkeit vom pH ihr Absorptionsmaximum besitzt. Der Extinktionswert bei 260 nm (optische Dichte OD) ist ein Maß für die Menge an DNA in 1 ml Lösung, gemessen in einer Küvette von 1 cm Schichtdicke.

#### 4.3 Qualitative DNA-Bestimmung und Erstellung einer Eichkurve

Die qualitative DNA-Bestimmung erfolgt nach Fischer-Burton:

- Mischen von 2 ml Reagenz mit 1 ml 5 %  $\text{HClO}_4$  und gelöster DNA.
- Ansetzen eines Blindwertes ohne Nukleinsäure und eines Kontrollwertes in gleicher Weise. Die Röhrchen bleiben nach Abdeckung mit Marmeln, zur Vermeidung von Lösungsmittelverdampfung und damit Konzentrationsänderung, sechzehn Stunden bei Raumtemperatur stehen.
- Spektralphotometrische Auswertung der je nach OD-Gehalt der Lösung unterschiedlich intensiven Blaufärbung.
- Eichung des Spektralphotometers bei E 595 visible und Ablesung der Extinktionswerte bei den Wellenlängen 565 - 595 - 625 nm.
- Bestimmung der Extinktion nach der Formel  $E_{595} \times 2 - (E_{565} + E_{625})$ .
- Erstellung der Eichkurve mittels Kalbsthymus-DNA (1 mg/ml) (Abb. 2).

An Hand der Eichkurve wird die DNA-Menge in  $\mu\text{g}$  abgelesen, die einem bestimmten Extinktionswert zugehört. Bei Umrechnung in die Menge an DNA, die dabei 1 OD in 1 ml Lösung bei 1 cm Küvettenschichtdicke entspricht, sollte der Wert bei Reinheit der Nukleinsäure zwischen 60 und 64  $\mu\text{g}$  liegen. Kleinere Werte bedeuten, daß noch RNA enthalten und eine weitere RNA-Verdauung notwendig ist.

#### 4.4 Hybridisierung DNA:DNA

Da native DNA ein langes, geknäueltes, doppelsträngiges Molekül darstellt, mußte sie vor einer weiteren Verarbeitung in kleinere Bruchstücke geeigneter Größe (300 - 400 Nukleotide) gespalten werden. Dies ist mit hochenergetischen Schallwellen (Ultrasonic Disintegrator, 6 - 8 Microns)  $3 \times 30''$  in Eis möglich. Die Überprüfung der Effektivität der Beschallung erfolgte elektro-phoretisch.

Die gelöste DNA wurde in silikonisierte Netheler-Becher pipettiert, bei  $-80^\circ\text{C}$  tiefgefroren, lyophilisiert, anschließend mit 80  $\mu\text{l}$  1/1  $\text{NaPO}_4$  + 10  $\mu\text{l}$  3 % SDS + 10  $\mu\text{l}$  ( $^3\text{H}$ )B16cDNA versetzt (Endkonzentration: 0,8 M), durch 10' Kochen bei  $100^\circ\text{C}$  denaturiert und danach sofort eiskühlt. Die DNA-Bruchstücke liegen nun als Einzelstränge vor, da nur diese sich für die Reaktion eignen.

Anschließend Inkubation im Wasserbad bei 68° C zur Paarung vorhandener komplementärer Sequenzen; die Zeitdauer richtet sich nach der Nukleinsäurekonzentration und dem Cot-Wert ( $Cot = \frac{OD}{2} \times h$ ). Inkubationsstop durch Abschrecken in Eiswasser. Die Proben wurden mit 600 µl aqua dest. verdünnt und gut gemischt. Die Verdünnung ist erforderlich, da bei nachfolgendem Eluieren die Phosphationenkonzentration nicht höher als 0,14 M sein darf. Ansonsten werden die gebildeten Doppelstränge zusammen mit den Einzelsträngen herausgewaschen (Abb. 1) (weitere Details siehe Diskussionsteil).

#### 4.5 Hydroxylapatit-Säulenchromatographie

Die Auswertung der DNA:DNA-Hybride erfolgte mit Hilfe der Hydroxylapatit-Säulenchromatographie (siehe Diskussionsteil, 14, 22, 23). 10 g Hydroxylapatit wurden mit 50 ml Puffer 1 (10' stehen lassen) aufgeschwemmt, der fein disperse Überstand abgessogen und der Vorgang wiederholt.

Als Säulen dienten 5 ml-Plastikspritzen, die mit Filzplättchen belegt und mit Puffer 1 gut angefeuchtet wurden. Die Säulen standen im Wasserbad bei 60° C.

Das aufgeschwemmte Hydroxylapatit wurde eingefüllt und zweimal mit je 2 ml Puffer 1 gespült. 7 ml Aufschwemmung ergaben ein Hydroxylapatitbett von 4 cm Höhe.

Die Proben wurden aufgetragen und folgendermaßen gespült:

- |                           |                                        |
|---------------------------|----------------------------------------|
| 4 x mit je 1 ml Puffer 1: | Eluierung der Einzelstränge            |
| 2 x mit je 1 ml Puffer 1: | Leerwert                               |
| 4 x mit je 1 ml Puffer 3: | Eluierung der gebildeten Doppelstränge |

Weitere Einzelheiten zur Hydroxylapatit-Säulenchromatographie im Diskussionsteil.

Die einzelnen Proben wurden anschließend mit 10 ml Szintillator (Rotiszint 22) geschüttelt, 15' kühlgestellt und die Radioaktivität im Flüssigkeitsszintillationszähler der Firma Packard gemessen.

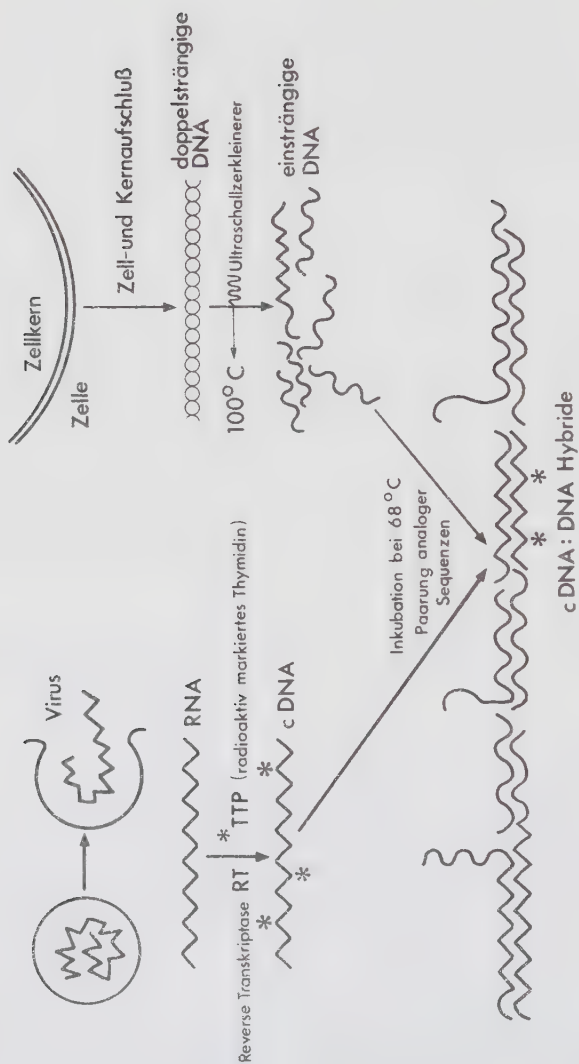


Abb. 1: Versuchsaufbau - cDNA:DNA-Hybridisierung  
Details der DNA-Extraktion und der Hybridisierungsbedingungen siehe Material und Methoden.

Die graphische Darstellung der Doppelstrangbildung in % (mittels der Radioaktivität cpm = counts per minute errechnet) gegen  $\log C_{ot}$  ergab die einzelnen Hybridisierungskurven (Abb. 5, 6, 7).

#### 4.6 Schmelzkurve

Ansetzen eines möglichst hohen  $C_{ot}$ -Wertes. Hybridisierung nach obigem Arbeitsgang. Eluierung der Einzelstränge bei  $60^{\circ} C$  mit Puffer 1. Anschließend schrittweise Temperaturerhöhung des Wasserbades von  $60^{\circ} C$  auf  $100^{\circ} C$  um jeweils  $5^{\circ} C$ . Auswaschen der nach jedem Temperaturanstieg dissoziierten Sequenzen (gebildete Doppelstränge trennen sich bei höherer Temperatur wieder) mit  $4 \times 1 \text{ ml } 0,12 \text{ M Phosphatpuffer}$  und Bestimmung des jeweiligen Radioaktivitätsgehalts (nähere Details siehe Ergebnisse und Diskussionsteil).

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Qualitative DNA-Bestimmung und Erstellung einer Eichkurve mit Kalbsthymus-DNA

Tab. 1: Qualitative DNA-Bestimmung nach Fischer-Burton mit Kalbsthymus-DNA im Beckman DB-Spektralphotometer

|                         | E 565 | E 595 | E 625 | E 595 x 2 -<br>(E 565 + E 625) |
|-------------------------|-------|-------|-------|--------------------------------|
| 20 µl Kalbsthymus-DNA:  | 0,140 | 0,186 | 0,130 | 0,102                          |
|                         | 0,145 | 0,191 | 0,135 | 0,102                          |
| 40 µl Kalbsthymus-DNA:  | 0,278 | 0,371 | 0,261 | 0,203                          |
|                         | 0,289 | 0,385 | 0,270 | 0,211                          |
| 60 µl Kalbsthymus-DNA:  | 0,399 | 0,530 | 0,371 | 0,290                          |
|                         | 0,400 | 0,535 | 0,372 | 0,298                          |
| 75 µl Kalbsthymus-DNA:  | 0,460 | 0,615 | 0,429 | 0,341                          |
|                         | 0,479 | 0,630 | 0,439 | 0,342                          |
| 100 µl Kalbsthymus-DNA: | 0,580 | 0,759 | 0,522 | 0,416                          |
|                         | 0,581 | 0,760 | 0,519 | 0,420                          |

Auffüllen der im Ansatz befindlichen DNA-Mengen (20 µl, 40 µl, 60 µl, 75 µl, 100 µl) mit aqua dest. auf 100 µl und Zugabe von 0,9 ml  $\text{HClO}_4$  + 2 ml Reagenz. Spektralphotometrische Auswertung im Beckman DB bei den Wellenlängen 565, 595 und 625 nm (graphische Darstellung siehe Abb. 2).

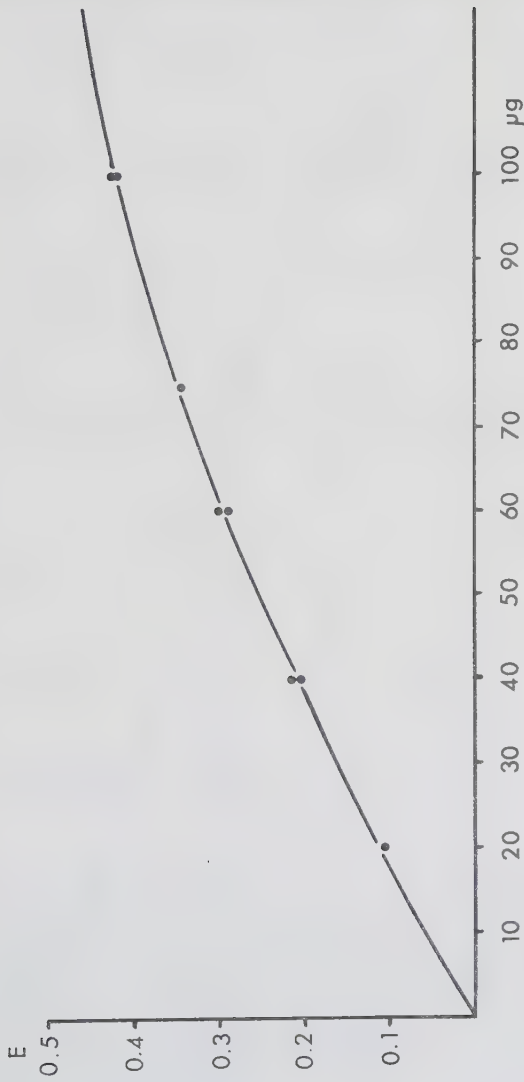


Abb. 2: DNA-Eichkurve nach Fischer-Burton mit Kalbsthymus-DNA (1 µg/µl)

Abszisse: Kalbsthymus-DNA in µg

Ordinate: Extinktion von 0 - 1 nach der Formel  $E_{595} \times 2 - (E_{565} + E_{625})$

5.2 Quantitative DNA-Bestimmung (Messungen im Beckman DB-Spektral-  
photometer)

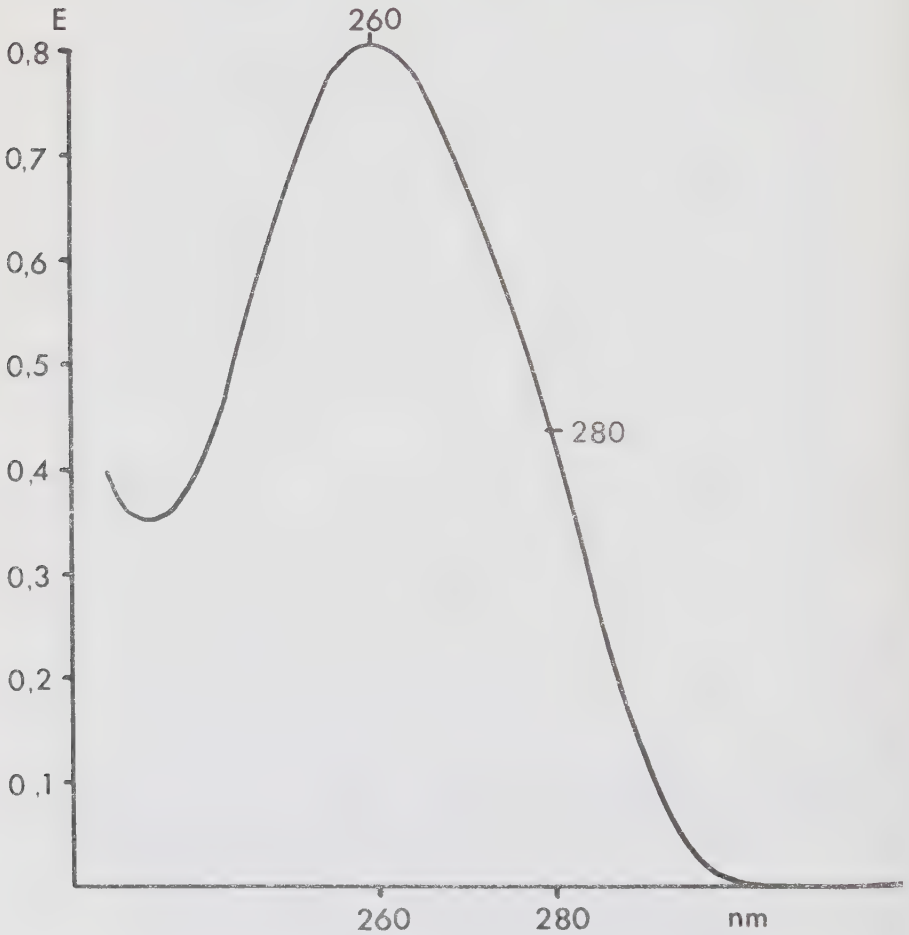


Abb. 3: Aufzeichnung eines Nukleinsäurespektrums (Mausleber-DNA) mittels des Servigor S Potentiometerschreibers

Abszisse: Wellenlänge von 0 - 320 nm

Ordinate: Extinktion von 0 - 1

Im Ansatz: Mausleber-DNA, 1:10 verdünnt, in einer Mikroküvette mit einer Schichtdicke von 0,1 cm. Ablesung der Extinktion bei 260 nm (Gipfel des Nukleinsäurespektrums): 0,805. Umrechnung in die Konzentrationsangabe OD/ml:  $0,805 \times 10 \times 10 = 80,5$

OD ist die Menge DNA in 1 ml Lösung bei 1 cm Küvettenschichtdicke. Das Verhältnis  $\frac{A_{260}}{A_{280}} = \frac{0,805}{0,434} = 1,86$  spricht für die Reinheit der DNA (siehe 2.2).

### 5.3 Qualitative Nukleinsäurebestimmung mit Hamster-, Spalthaut- und Kalbsthymus-DNA

Tab. 2: Qualitative DNA-Bestimmung nach Fischer-Burton mit Hamster-DNA, Spalthaut-DNA und Kalbsthymus-DNA im Beckman DB-Spektralphotometer

|                        | E 565 | E 595 | E 625 | E 595 x 2 -<br>(E 565 + E 625) |           |
|------------------------|-------|-------|-------|--------------------------------|-----------|
| 10 µl Hamster-DNA :    | 0,301 | 0,400 | 0,281 | 0,218                          | → 45,0 µg |
|                        | 0,318 | 0,427 | 0,299 | 0,237                          |           |
| 30 µl Spalthaut-DNA :  | 0,308 | 0,409 | 0,287 | 0,223                          | → 45,5 µg |
|                        | 0,321 | 0,429 | 0,300 | 0,237                          |           |
| 40 µl Kalbsthymus-DNA: | 0,284 | 0,378 | 0,262 | 0,210                          | → 40,5 µg |
|                        | 0,289 | 0,385 | 0,269 | 0,212                          |           |

Die Extinktion (E 595 x 2 - (E 565 + E 625) = 0,210) von Kalbsthymus-DNA (1 mg/ml) ergibt eine Menge von 40,5 µg beim Einsatz von 40 µl. Dieser Kontrollwert beweist die Aussagekräftigkeit der Extinktionswerte.

Errechnung der Menge (in µg) an DNA einer gegebenen Konzentration (in OD/ml), die einem OD entspricht. Werte zwischen 60 und 64 µg sprechen für die Reinheit der eingesetzten Nukleinsäure.

Beispiel: Hamster-DNA mit 70 OD/ml  $1 \text{ OD} \cong \frac{45 \cdot 1000}{70 \cdot 10} \mu\text{g} \cong 64 \mu\text{g}$

Spalthaut-DNA mit 24,3 OD/ml  $1 \text{ OD} \cong \frac{45,5 \cdot 1000}{24,3 \cdot 30} \mu\text{g} \cong 62,4 \mu\text{g}$

#### 5.4 Schmelzkurven mit Hamster-, Naevus- und Maus-DNA

Erstellung von Schmelzkurven mit Hamster-DNA, Naevus-DNA und Maus-DNA. Bei jeder Temperaturerhöhung wird ein bestimmter Prozentsatz der gepaarten, analogen Basen wieder getrennt. Je perfekter die Basenpaarung desto höhere Temperaturen sind zur Dissoziation notwendig und desto größer ist die Steilheit der Kurven (Abb. 4).

Tab. 3: Thermische Stabilität der Hybride: B16cDNA:Hamster-DNA  
B16cDNA:Naevus-DNA  
B16cDNA:Maus-DNA

| Temp. in ° C | Zählausbeute (cpm = counts per minute) der bei jedem Temperaturanstieg dissoziierten Basenpaare, Normung auf 100 % |            |          |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|----------|
|              | Hamster-DNA                                                                                                        | Naevus-DNA | Maus-DNA |
| 60° C        | 0                                                                                                                  | 0          | 0        |
| 65° C        | 25,7                                                                                                               | 38,6       | 6,45     |
| 70° C        | 48,5                                                                                                               | 22,5       | 20,9     |
| 75° C        | 19,8                                                                                                               | 12,8       | 37,6     |
| 80° C        | 10,3                                                                                                               | 7,77       | 25,3     |
| 85° C        |                                                                                                                    | 8,3        | 9,4      |
| 90° C        |                                                                                                                    | 4,55       |          |
| 95° C        |                                                                                                                    | 4,82       |          |

Zu Seite 33:

Abb. 4: Schmelzkurven: B16cDNA:Hamster-DNA  
B16cDNA:Maus-DNA  
B16cDNA:Naevus-DNA

Details siehe 4.6

Abszisse: Temperatur von 60° C - 100° C

Ordinate: Prozentsatz der bei jeder Temperaturerhöhung wieder gelöst Doppelstränge. Normung der cpm (counts per minute) der Hybride eines jeden Reaktionsschrittes auf 100 %.

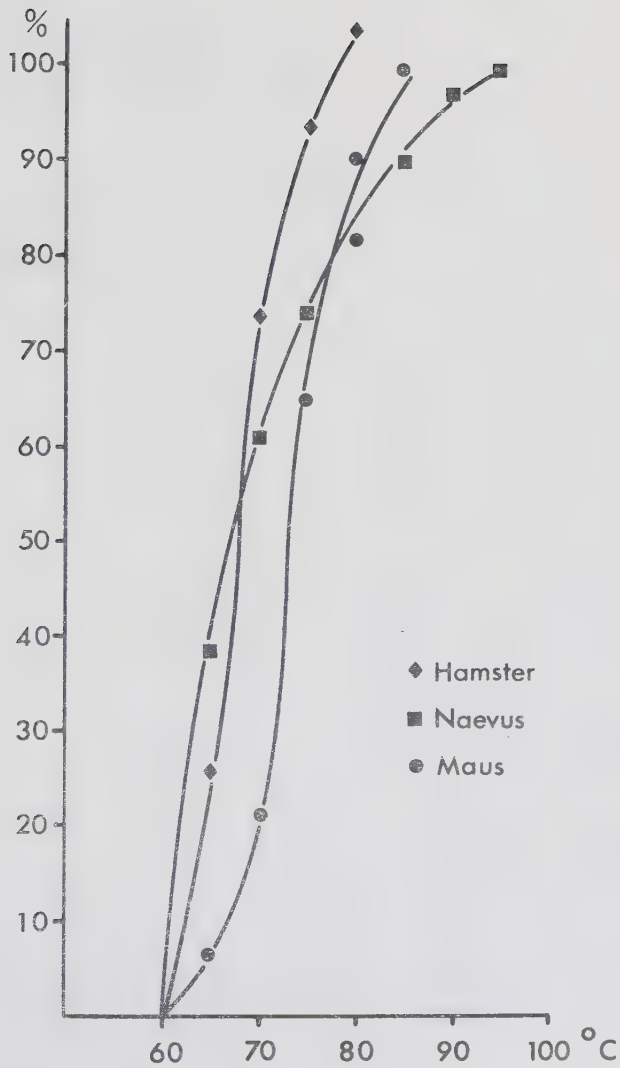


Abb. 4: siehe Seite 32

## 5.5 Hybridisierungsergebnisse

Anmerkungen zu Tab. 4, 5, 6, 7: Cot ist die Hybridisierungsmeßgröße. Angesichts der Größenunterschiede ist Logarithmieren zweckmäßig (log Cot). Weitere Details siehe Diskussionsteil.

Tab. 4: Hybridisierung: B16cDNA:Maus-DNA (Leber) (Abb. 5)

| Cot   | log Cot | Ausmaß der Doppelstrangbildung (dem jeweiligen Cot-Wert entsprechend) in % |
|-------|---------|----------------------------------------------------------------------------|
| 0,01  | - 2,0   | 4,62                                                                       |
| 0,03  | - 1,5   | 3,1                                                                        |
| 0,1   | - 1,0   | 4,66/4,45                                                                  |
| 0,36  | - 0,44  | 5,05                                                                       |
| 1,08  | 0,033   | 12,05                                                                      |
| 1,69  | 0,228   | 14,0                                                                       |
| 1,98  | 0,3     | 13,9                                                                       |
| 2,08  | 0,318   | 43,63/43,9                                                                 |
| 4,16  | 0,619   | 50,74/46,05                                                                |
| 11,46 | 1,059   | 56,11/52,07                                                                |
| 36,0  | 1,55    | 63,0                                                                       |
| 114,6 | 2,059   | 76,11                                                                      |
| 458,0 | 2,66    | 76,87/71,67                                                                |

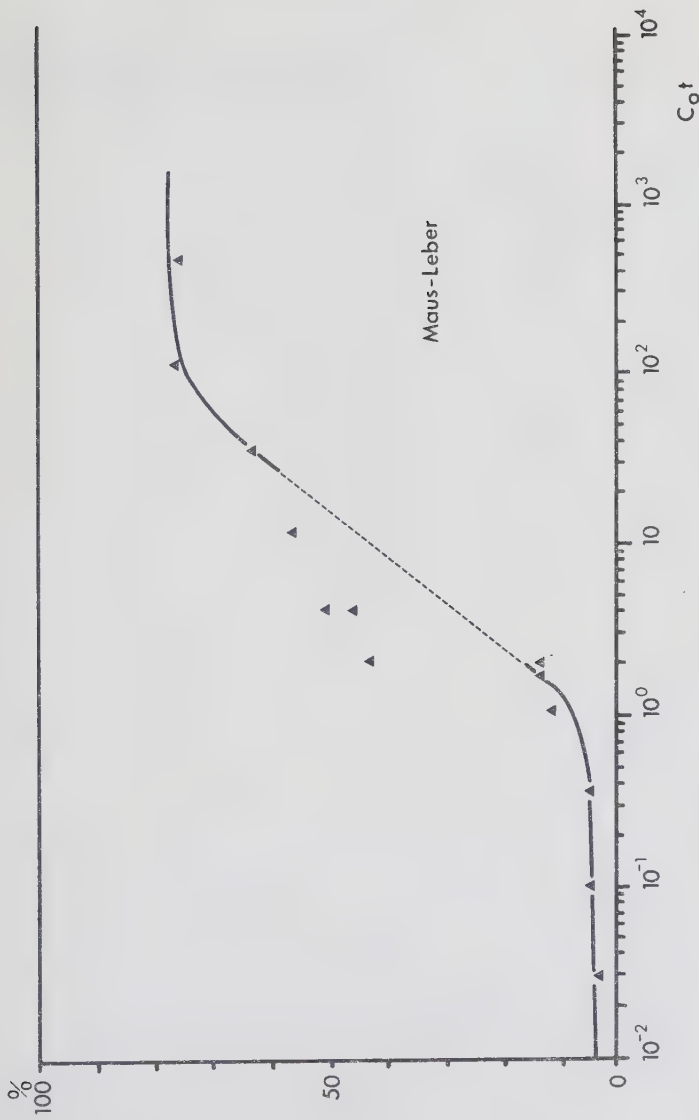


Abb. 5: Hybridisierung: B16cDNA:Mausleber-DNA

Das Ausmaß der Doppelstrangbildung (cDNA:DNA-Hybride) in % wurde gegen log Cot ( $Cot = \frac{OD}{2} \cdot h$ ) aufgetragen.  
Hybridisierungsbedingungen und Versuchsauswertung siehe Material und Methoden (4.4, 4.5).

Tab. 5: Hybridisierung: B16cDNA:Hamsterleber-DNA (Abb. 6)

| Cot     | log Cot | Ausmaß der Doppelstrangbildung (dem jeweiligen Cot-Wert entsprechend) in % |
|---------|---------|----------------------------------------------------------------------------|
| 0,03    | - 1,5   | 3,5                                                                        |
| 0,1     | - 1,0   | 6,25/3,42                                                                  |
| 0,3     | - 0,52  | 5,6/6,4                                                                    |
| 0,525   | - 0,279 | 7,1                                                                        |
| 0,78    | - 0,1   | 10,2                                                                       |
| 1,49    | 0,175   | 13,0                                                                       |
| 2,0     | 0,3     | 18,0                                                                       |
| 2,39    | 0,38    | 48,08/46,07                                                                |
| 4,79    | 0,68    | 50,59/54,76                                                                |
| 9,58    | 0,98    | 52,14/50,3                                                                 |
| 35,92   | 1,55    | 52,66/51,72                                                                |
| 98,0    | 1,99    | 53,97/45,58                                                                |
| 924,0   | 2,96    | 59,83/52,14                                                                |
| 4112,75 |         | 53,0                                                                       |

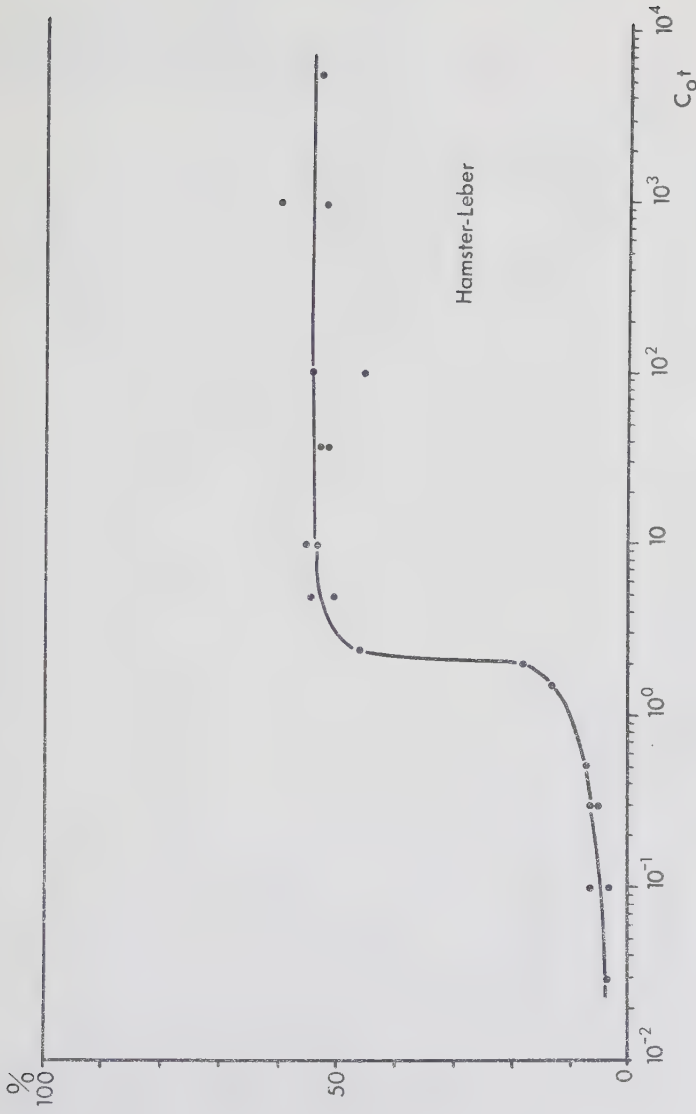


Abb. 6: Hybridisierung: B16cDNA:Hamsterleber-DNA  
Das Ausmaß der Doppelstrangbildung (cDNA:DNA-Hybride) in % wurde gegen  $\log C_{ot}$   
( $C_{ot} = \frac{OD}{2} \cdot h$ ) aufgetragen.  
Hybridisierungsbedingungen und Versuchsauswertung siehe Material und Methoden (4.4, 4.5).

Tab. 6: Hybridisierung: B16cDNA:Spalthaut-DNA (Abb. 7)

| Cot    | log Cot | Ausmaß der Doppelstrangbildung (dem jeweiligen Cot-Wert entsprechend) in % |
|--------|---------|----------------------------------------------------------------------------|
| 10,95  | 1,03    | 4,24/5,95                                                                  |
| 92,52  | 1,96    | 9,09                                                                       |
| 184,6  | 2,26    | 10,0/17,0                                                                  |
| 243,0  | 2,38    | 16,8/7,3                                                                   |
| 379,0  | 2,578   | 18,96                                                                      |
| 788,0  | 2,89    | 45,77                                                                      |
| 3153,6 | 3,49    | 39,03/46,81                                                                |

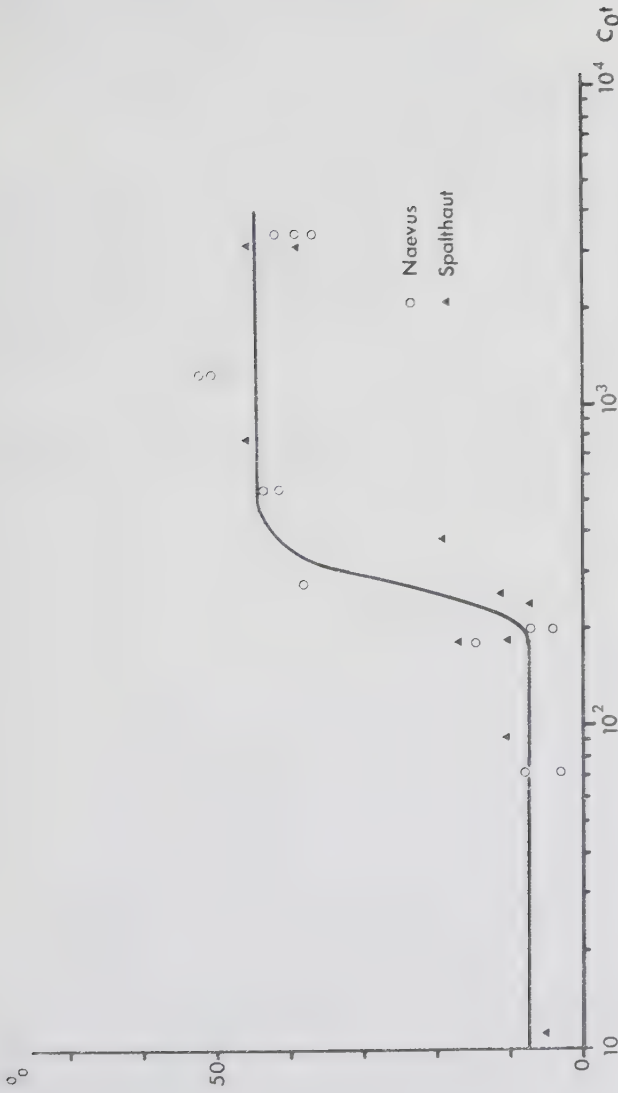


Abb. 7: Hybridisierungen: B16cDNA:Naevus-DNA

B16cDNA:Spalthaut-DNA

Das Ausmaß der Doppelstrangbildung (cDNA:DNA-Hybride) in % wurde gegen  $\log Cot$  ( $Cot = \frac{OD}{2} \cdot h$ ) aufgetragen. Naevus- und Spalthaut-DNA weisen eine identische Hybridisierungskurve auf. Hybridisierungsbedingungen und Versuchsauswertung siehe Material und Methoden (4.4, 4.5).

Tab. 7: Hybridisierung: B16cDNA:Naevus-DNA (Abb. 7)

| Cot    | log Cot | Ausmaß der Doppelstrangbildung (dem jeweiligen Cot-Wert entsprechend) in % |
|--------|---------|----------------------------------------------------------------------------|
| 71,7   | 1,85    | 3,0/8,2                                                                    |
| 181,6  | 2,25    | 14,8                                                                       |
| 200,7  | 2,3     | 4,0/7,6                                                                    |
| 277,8  | 2,44    | 38,15                                                                      |
| 552,36 | 2,74    | 41,66/43,44                                                                |
| 1250,0 | 3,09    | 50,73/52,75                                                                |
| 3427,0 | 3,53    | 39,51/42,12                                                                |
| 3475,0 |         | 38,0                                                                       |

B16cDNA hybridisiert gegen

normale Mausleber-DNA bis zu 70 - 80 %,  $Cot_1 = 9 - 10$  (Abb. 5)

Hamsterleber-DNA bis zu 55 %,  $Cot_1 = 2 - 3$  (Abb. 6)

menschliche DNA bis zu 45 % (Abb. 7). Das Plateau von 45 % ist bei einem Cot-Wert von 400 erreicht. Spalthaut- und Naevus-DNA, die eine gemeinsame Kurve bilden, reagieren somit deutlich langsamer als tierische Nukleinsäuren.

Im Labor wurden parallel dazu folgende Versuchsergebnisse gewonnen:

B16cDNA hybridisiert gegen

B16 Melanom-DNA bis zu 90 %

Hamstermelanom A Me13-DNA bis zu 70 %

Basaliom-DNA bis zu 45 %

menschliche Melanom-DNA bis zu 70 %.

Vergleich der Kurven von Normalgewebe und Tumorgewebe: Abb. 8, 9, 10.

Versuchsaufbau siehe 4.4 und 4.5.

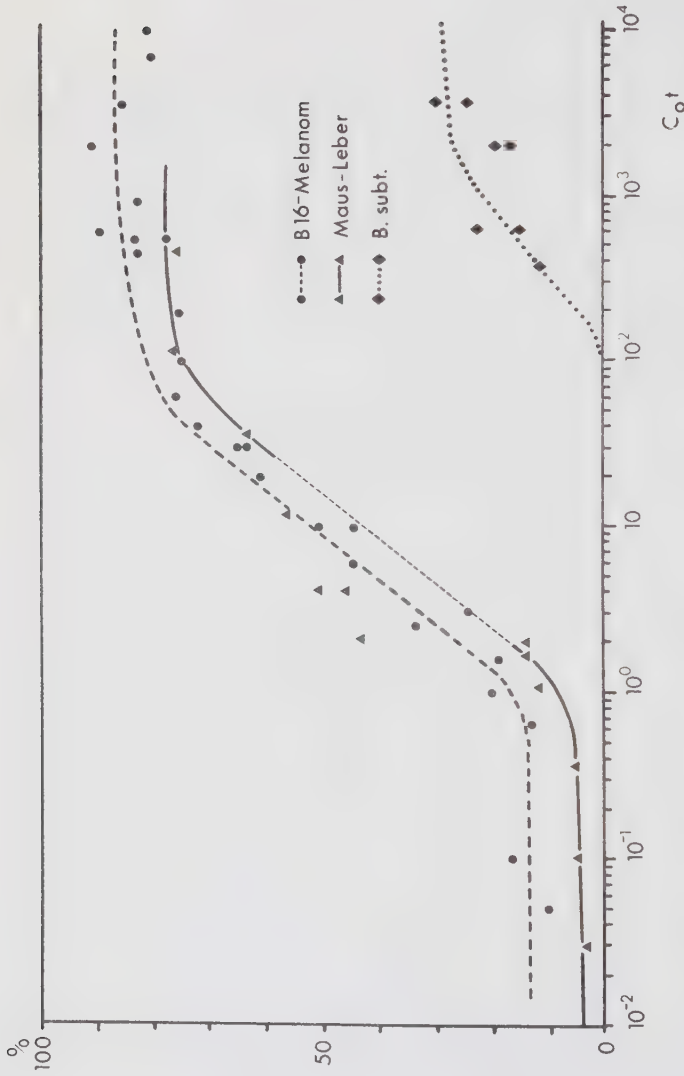


Abb. 8: Hybridisierungen: B16cDNA:B16-DNA

B16cDNA:Mausleber-DNA

B16cDNA:Bacterium subtilis-DNA

Vergleich des Kurvenverlaufs beim Einsatz von Tumorgewebe (B16-Melanom) bzw. Normalgewebe (Mausleber). B. subtilis dient als Kontrolle für die Spezifität dieser Reaktionen. Das Ausmaß der Doppelstrangbildung (cDNA:DNA-Hybride) in % wurde gegen  $\log C_{ot}$  aufgetragen. Siehe 4.4, 4.5.

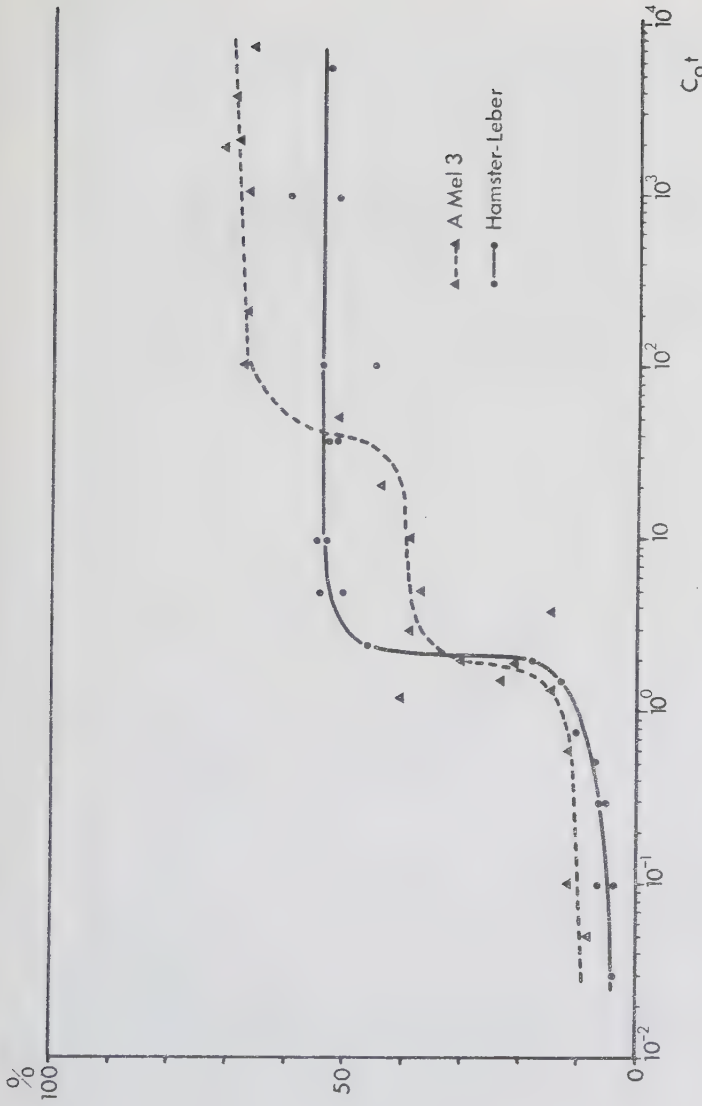


Abb. 9:

Hybridisierungen:

B16cDNA:A Mel3-DNA

B16cDNA:Hamsterleber-DNA

Vergleich des Kurvenverlaufs beim Einsatz von Tumorgewebe (A Mel3) bzw. Normalgewebe (Hamsterleber). Das Ausmaß der Doppelstrangbildung (cDNA:DNA-Hybride) in % wurde gegen  $\log C_{ot}$  ( $C_{ot} = \frac{OD}{2} \cdot h$ ) aufgetragen. Hybridisierungsbedingungen und Versuchsauswertung siehe Material und Methoden (4.4, 4.5).

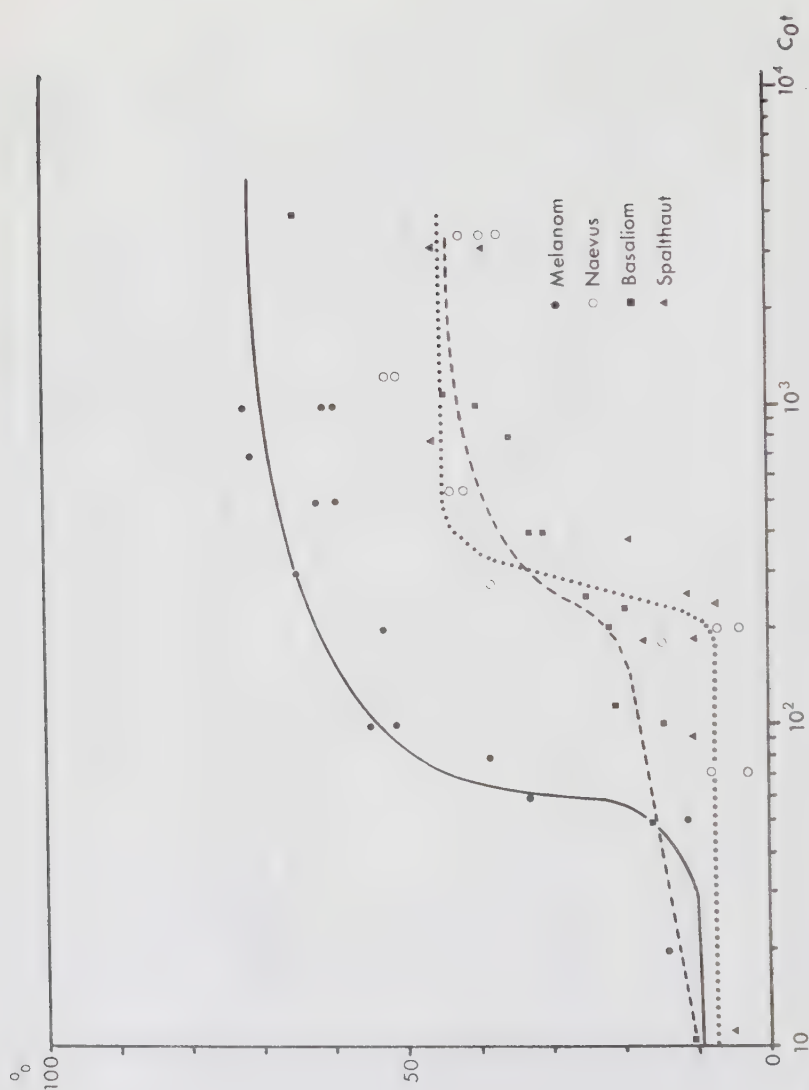


Abb. 10: siehe Seite 45

Zu Seite 44:

Abb. 10:   Hybridisierungen:   B16cDNA:menschliche Melanom-DNA  
                                  B16cDNA:Naevus-DNA  
                                  B16cDNA:Basaliom-DNA  
                                  B16cDNA:Spalthaut-DNA

Vergleich des Kurvenverlaufs beim Einsatz von Tumorgewebe (menschliches Melanom, Basaliom) bzw. Normalgewebe (Naevus, Spalthaut). Das Ausmaß der Doppelstrangbildung (cDNA:DNA-Hybride) in % wurde gegen log Cot aufgetragen. Spalthaut- und Naevus-DNA weisen eine identische Hybridisierungskurve auf. Hybridisierungsbedingungen und Versuchsauswertung blieben unverändert.

## 6. Diskussion

In jüngster Zeit gibt es Hinweise auf eine ursächliche Verknüpfung zwischen dem Vorhandensein onkogener RNA-Viren und der Entstehung maligner Melanome sowohl bei Tieren als auch beim Menschen (3, 5, 6, 8, 9, 18, 19, 20, 35, 36, 37, 38, 46, 47).

Voraussetzung für die Durchführung dieser Arbeit war der Nachweis der für Onkorna-Viren geforderten Eigenschaften (siehe 1.4). Im simultaneous detection test wurde eine hochmolekulare 70S-RNA gefunden. Die 70S-RNA/reverse Transkriptase-Komplexe, die in einem 20 - 50 %igen Zuckergradienten dichte-fractioniert wurden, besaßen die charakteristische Dichte von 1,16 bis 1,19 g/cm<sup>3</sup> (50).

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, dieser Frage mit der Technik der molekularen Nukleinsäurehybridisierung nachzugehen. Diese beruht darauf, daß mit Hilfe der reversen Transkriptase eine komplementäre DNA des RNA-Moleküls, von dem angenommen wird, daß es virusspezifisch ist, synthetisiert wird. Die komplementäre DNA dient als Markermolekül, um das Ausmaß der cDNA:DNA-Hybridisierungen mittels der Hydroxylapatit-Säulenchromatographie festzustellen (14, 22, 23).

Einzelsträngige Nukleinsäuren haben das spontane Bestreben, sich zu Doppelsträngen zusammenzulagern. Die thermische Stabilität  $T_M = T_{50}$  ist dabei ein Maß für die Genauigkeit der Basenpaarung. Native doppelsträngige DNA hat den höchsten  $T_M$ -Wert (22).

Bei Hybridisierungen können Ungenauigkeiten auftreten, indem sich Sequenzen paaren, die nicht 100 %ig komplementär sind, oder indem homologe Abschnitte nicht-komplementäre Regionen mitschleppen. Je flacher nun die Schmelzkurve verläuft und je niedriger  $T_M$  liegt, desto unspezifischer ist die Basenpaarung. Dabei gilt, daß 1,5 % nicht-zusammenpassende Basenpaare die thermische Stabilität um jeweils 1° C senken. Hybridisierungen im heterologen System reduzieren  $T_M$  (42).

Britten et al. (22, 23) zeigten, daß die hier gewählte Methode der Hydroxylapatit-Säulenchromatographie gegenüber anderen Techniken (optische Hypochromizität, DNA-Agar-Technik, Membranfilter) Vorteile hat:

1. Einzel- und Doppelstränge lassen sich leicht und routinemäßig trennen.
2. Verschiedene DNA-Mengen können in einem Arbeitsgang eingesetzt werden.
3. Schmelzkurven erlauben eine Überprüfung der Spezifität der Basenpaarung.
4. Standardansätze können als Kontrolle in den Arbeitsgang eingeschlossen werden.
5. Die charakteristischen physikalischen, chemischen und biologischen Eigenschaften der Nukleinsäuren bleiben erhalten.
6. Die Ergebnisse sind leicht reproduzierbar, ohne daß darunter die Genauigkeit der Methode leidet.
7. Die Möglichkeit, bestimmte Salzkonzentrationen und Temperaturen im Versuch einzuhalten, ist gewährleistet.

Die Nukleinsäuren werden an das Hydroxylapatit adsorbiert und anschließend mit verschiedenen Phosphatpuffern, die hinsichtlich ihres pH dafür gut geeignet sind, eluiert. Die Elution ist von der Molarität der Phosphatpuffer und der Temperatur des Wasserbades abhängig (s. unten). Doppelsträngige und korrekt gepaarte DNA besitzt eine höhere Affinität zu Hydroxylapatit als einzelsträngige oder unspezifisch gepaarte DNA (22).

Bei zu niedrig gewählter Ionenkonzentration der Puffer werden einzelsträngige DNA-Abschnitte und schlecht gepaarte Nukleinsäuresequenzen zusammen mit doppelsträngiger, korrekt gepaarter DNA in den Säulen zurückgehalten; bei zu hoher Konzentration geht mit Ausnahme nahezu perfekt gepaarter analoger Basenabschnitte alles verloren.

In diesem Versuch wurde die einsträngige DNA mit Puffer 1, der eine Molarität von 0,12 besitzt, eluiert. Die gebildeten Doppelstränge wurden mit Puffer 3 mit einer Molarität von 0,4 aus den Säulen gewaschen.

Die Temperatur des Wasserbades, die die Elution ebenfalls beeinflusst, muß zur Phosphationenkonzentration im Gleichgewicht stehen. Sie wurde zur Ionenstärke von Puffer 1 (0,12 M) auf 60° C eingestellt.

Das Ausmaß der Basenpaarung ist von äußeren Versuchsbedingungen abhängig (44):

1. Die Kationenkonzentration (vor allem Na<sup>+</sup>) hat großen Einfluß auf die

Reaktion. Je niedriger die Salzkonzentration liegt, desto langsamer läuft die Zusammenlagerung einzelsträngiger Nukleinsäuren zu Doppelsträngen ab. Unter 0,01 M wird die Reaktion gestoppt; wohingegen sie bei einer Ionenstärke über 0,4 M von der Salzkonzentration nahezu unabhängig ist.

2. Die Inkubationstemperatur soll 20 - 30° C unter der Schmelztemperatur der doppelsträngigen DNA liegen.
3. Die Länge der DNA-Stücke ist für das Ausmaß der Paarung von entscheidender Bedeutung. Native DNA ist eine doppelsträngige Helix aus  $6 \times 10^9$  Nukleotidpaaren und einem Molekulargewicht von  $10^9$  (60). Wasserstoffbrücken und Wechselwirkungen zwischen hydrophoben Basen bedingen eine Verdrillung und Knäuelung. Die dreidimensionale Struktur stellt ein Hindernis dar, so daß sich eventuell vorhandene homologe Sequenzen aus sterischen Gründen nicht paaren.  
In diesem Versuch wurde deshalb das Nukleinsäuremolekül mittels Ultraschall in kleinere Bruchstücke zerlegt. Diese besaßen eine Größe von 300 - 400 Nukleotiden, die mit 4 - 6 S sedimentierten.
4. Die Komplexität der DNA und die Lösungsviskosität haben auf die Reaktionsrate Einfluß. Es besteht umgekehrte Proportionalität (61).
5. Der Cot-Wert muß genügend groß sein, damit sich homologe Sequenzen gemäß der Brownschen Molekularbewegungen paaren können.

Die Inkubationszeit wurde in diesem Versuch nicht länger als 72 Stunden angesetzt, um falsch positive Ergebnisse zu verhindern. Die Konzentration der radioaktiv-markierten B16cDNA betrug nur 0,38 OD/ml, so daß die Möglichkeit, daß sich radioaktive, komplementäre Basen paaren, weitgehend ausgeschaltet war. Die nicht-radioaktive DNA lag in großem Überschuß vor. Die Hybridisierungsreaktion konnte somit in der Inkubationszeit vollständig ablaufen (42).

Folgender theoretischer Hintergrund liegt den Hybridisierungen zugrunde: Hybridisierungen weisen im Idealfall eine Kinetik 2. Ordnung auf. Die Reaktionen sind vom Cot-Wert abhängig. Der Cot-Wert ist folgendermaßen definiert (43):

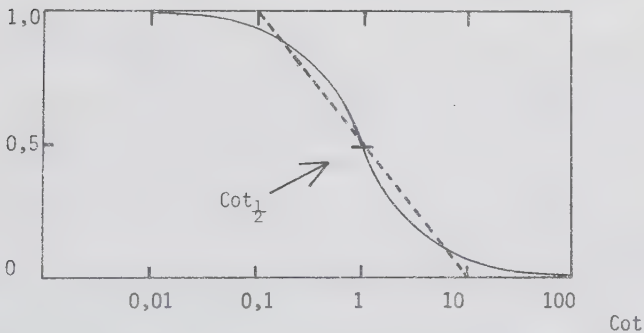
$$\frac{\text{optische Dichte der DNA bei 260 nm}}{2} \times \text{Inkubationszeit}$$

$$\text{Cot} = \frac{\text{OD}}{2} \cdot h$$

Dies entspricht annähernd der gewöhnlichen Einheit  $\frac{\text{mol} \cdot \text{sec}}{1}$ . Unter diesen Bedingungen beträgt der Extinktionskoeffizient der Nukleinsäure ungefähr 7200.

$\frac{C}{C_0}$  wird gegen  $\log \text{Cot}$  aufgetragen. Im Idealfall ergibt sich folgende sigmoide Kurve (23). Es gilt dabei  $\frac{C}{C_0} = \frac{1}{1 + K \cdot \text{Cot}}$

Abb. 11: Reaktionskinetik einer reassoziierenden DNA mit einem schnellen und einem langsamen Anteil. Die DNA wurde in Bruchstücke geeigneter Größe (300 - 400 Nukleotiden) zerlegt. Sequenzen, die sich schnell wieder zusammenlagern, sind diejenigen, die mehrfach im haploiden Satz der Zelle vorhanden, während die Abschnitte, die sich langsam wiedervereinigen, nur einmal im Genom zu finden sind (43)



(nach Britten, Kohne (23))

$C$  = Konzentration der verbliebenen, einsträngigen DNA

$C_0$  = gesamte DNA-Konzentration

$K$  = Reaktionskonstante;  $K$  ist von den Inkubationsbedingungen abhängig und indirekt proportional zur Komplexität der Nukleinsäure;  $K$  wird in diesem Fall gleich 1 gesetzt.

Höhere Organismen enthalten repetitive und nicht-repetitive Sequenzen (23). Für den Menschen wird vermutet, daß mindestens 21 % der DNA mehrfach vorhanden sind.

Je mehr repetitive Abschnitte im Genom einer Spezies zu finden sind, desto schneller läuft eine Reassoziations beziehungsweise Hybridisierung ab.

$Cot_{1/2}$  ist ein Maß für die Reaktionsgeschwindigkeit und für die jeweilige DNA spezifisch. Der  $Cot_{1/2}$ -Wert ist dabei umso kleiner, je größer die Sequenzhomologie, je mehr repetitive DNA vorhanden und je geringer die Komplexität und Genomgröße der Nukleinsäure ist (43).

Die  $Cot_{1/2}$ -Werte der Kurven B16cDNA:Mausleber-DNA und B16cDNA:Hamsterleber-DNA sind wesentlich kleiner als  $Cot_{1/2}$  der Hybridisierung B16cDNA:Spalthaut-DNA. Das spricht für einen deutlichen Unterschied zwischen menschlicher und tierischer DNA, sowie für einen komplexeren Aufbau des menschlichen Erbguts.

Obwohl die Hybridisierungen mit großer Sorgfalt durchgeführt wurden, sind grundsätzlich folgende Fehlermöglichkeiten zu erwägen:

- Tumorspezifische Gene sind nur in kleiner Zahl vorhanden, so daß der Unterschied zwischen Normal- und Tumor-DNA sehr gering ist.
- Die transformierende Eigenschaft ist nur an etwa 10 - 20 % des viralen Genoms gebunden (27).
- Ferner ist es denkbar, daß jede Zelle diese onkogene Sequenz enthält, die in Normalgewebe jedoch durch Kontrollmechanismen unterdrückt wird. Die Reprimierung kann durch irgendein auslösendes Ereignis aufgehoben worden sein (siehe 1.1.1).
- Auch muß erwogen werden, daß trotz sorgfältiger Kontrolle keine tumorspezifische DNA synthetisiert wurde. Der deutliche Hybridisierungsunterschied widerspricht aber der Annahme eines Artefakts.
- Obwohl die Reinheit des reverse Transkriptase-Komplexes nachgewiesen wurde, ist nicht zweifelsfrei ausschließbar, daß unspezifische Zellprodukte gleicher Dichte vorhanden sind, die das Ergebnis verfälschen. Zwar haben wir uns bemüht, sämtliche Verunreinigungen zu eliminieren, doch könnten am Syntheseprodukt noch hybridisierende RNA-Reste hängen. Zusätzliche NaOH-

Verdauung und ein mehrfaches Umfällen des Produktes wären für die weitere Reinigung und damit zur Erhöhung der Spezifität notwendig (die Richtigkeit dieser Annahme hat sich in ersten Vorversuchen bestätigt).

Wie in Methoden und Ergebnisse dargestellt, wurden zahlreiche Kontrollen durchgeführt, um diese möglichen Fehler auszuschalten.

Unter Berücksichtigung dieser Tatsache glauben wir, weitere Hinweise für die Ausgangshypothese gefunden zu haben. Ein endgültiger Beweis ist mit dieser Technik aber noch nicht möglich.

Die Unterschiede im Ausmaß der Hybridisierung sind von entscheidender Bedeutung. B16cDNA reagiert mit Mausleber-DNA bis zu 70 - 80 %, mit B16 Melanom-DNA dagegen bis zu 90 %. Der kleinere  $Cot_2$ -Wert der Melanomkurve und die schneller ablaufende Reaktion weisen auf eine größere Sequenzhomologie hin.

Diesen Unterschied im Hybridisierungsausmaß von fast 20 % konnten auch Hehlmann und Erfle (38) bei der Hybridisierung von B16cDNA:B16 Melanom-DNA bzw. B16cDNA:C57BL Mäusehaut-DNA nachweisen.

Die Spezifität dieser Reaktionen wird dadurch belegt, daß Bacterium subtilis-DNA mit B16cDNA in einem nur geringen Ausmaß und erst bei einem  $Cot$ -Wert größer  $10^2$  hybridisiert (Abb. 8).

Analoge Hybridisierungen mit Hamster-DNA zeigen, daß sich mit DNA aus Normalgewebe 15 % weniger Doppelstränge bilden als mit Tumor-DNA (A Mel3) (Abb. 9). Der stufige Kurvenverlauf ist noch nicht erklärbar.

Die größten Unterschiede werden mit menschlicher DNA erreicht. Menschliche Melanom-DNA reagiert mit B16cDNA wesentlich schneller als Spalthaut-, Naevus- und Basaliom-DNA. Ein Hybridisierungsunterschied gegenüber DNA aus Normalgewebe von 20 - 30 % ist nachweisbar (Abb. 10).

Naevus-, Spalthaut- und Basaliom-DNA weisen fast identische Hybridisierungskurven auf, die deutlich von derjenigen des Melanoms abweichen.

Wir schließen daraus, daß Basaliome und Melanome keine gemeinsamen tumorspezifischen Sequenzen besitzen. Auf der anderen Seite können Naevuszellen nicht

mehr länger als Vorstufe zur malignen Entartung, gewissermaßen als "ruhendes Melanom" aufgefaßt werden.

Ähnliche Versuche, die die gleiche Interpretation gestatten, sind bereits früher durchgeführt worden (35, 36, 37). In jenen Hybridisierungen wurde aber mit RNA und nicht wie in diesem Versuch mit DNA verschiedener Herkunft gearbeitet. Die Hybridisierungen Mäusemelanom ( $^3\text{H}$ )cDNA:RNA aus Normalgewebe beziehungsweise RNA aus Tumoren epithelialer Herkunft wiesen keine Homologie auf (35, 36). Die Reaktion von ( $^3\text{H}$ )cDNA aus menschlichen Melanomen gegen die RNA verschiedener Hauttumoren verlief ebenfalls negativ. ( $^3\text{H}$ )cDNA aus Basaliomen reagierte mit der eigenen Matrizen-RNA, nicht jedoch mit der RNA menschlicher Melanompartikel (35, 36).

Ebenso wie wir (Balda, unveröffentlichte Versuche) erzielte Parsons bei der Durchführung des simultaneous detection test mit Naevuszellen und Normalhaut ein negatives Ergebnis (47).

Folgende Schlüsse können unter Betracht der Fehlermöglichkeiten aus den Versuchsergebnissen gezogen werden: Menschliche und tierische Melanome besitzen spezifische Gensequenzen, die in der DNA von Normalgewebe, Naevi und Basaliomen nicht nachweisbar sind.

Interessant war bei der Erstellung der Schmelzkurven die Feststellung, daß trotz offensichtlicher Ähnlichkeiten in elektronenmikroskopischer, biochemischer und biophysikalischer Hinsicht keine Homologie zwischen Mäuse- und Hamstermelanomen besteht.

Der höchste Schmelzpunkt, ein Maß für die Genauigkeit der Basenpaarung, wird mit Maus-DNA erzielt.

Die Schmelztemperaturen von Hamster- und Naevus-DNA liegen niedriger als die von Maus-DNA und weisen somit deutlich auf unterschiedliche Sequenzen hin. Die Steilheit der Schmelzkurven spricht für eine korrekte, spezifische Basenpaarung. Dies alles berechtigt zu der Schlußfolgerung, daß Hamster- und Mäusemelanome zwar phänotypisch ähnliche Tumoren sind, jedoch kein kausaler Zusammenhang zwischen beiden besteht. (Die Schmelztemperaturen liegen insgesamt etwas zu niedrig, da relativ wenig radioaktives Material im Ansatz war.)

Bei aller gebotenen Vorsicht einer Interpretation spricht vieles für einen infektionsähnlichen Übertragungsmodus, da gegenüber Normalgewebe vorher nicht vorhandene Gensequenzen neu auftreten. Diese melanomspezifischen Se-

quenzen wären damit im Rahmen einer horizontalen Transmission ins Genom der Zielzelle eingebaut worden.

## 7. Zusammenfassung

Es wurde versucht, mit Hilfe der Technik der molekularen Nukleinsäurehybridisierung onkogenes Virusmaterial in der DNA verschiedenen Ursprungs (Melanome, Naevi, Basaliome, Spalthaut) nachzuweisen. Als Quelle der radioaktiven, komplementären DNA wurde das B16 Mäusemelanom gewählt.

Die Hybridisierungsbedingungen wurden so festgelegt, daß alle denkbaren Fehler möglichst klein gehalten werden konnten. Zahlreiche Kontrollschritte sprechen für die Sorgfältigkeit der Präparation und die Reinheit des synthetisierten Produkts.

Es zeigte sich, daß ein signifikanter Unterschied zwischen der DNA von Normalgewebe und malignen Melanomen besteht. DNA aus Normalgewebe hybridisiert im Gegensatz zu DNA aus malignen Melanomen in einem deutlich geringeren Ausmaß mit B16cDNA. Dies läßt den Schluß auf das Auftreten neuer, spezifischer Gensequenzen in Melanomen und damit auf eine horizontale Transmission der für die Transformation verantwortlichen Gensequenzen zu.

Naevus-, Spalthaut- und Basaliom-DNA bilden nahezu identische Hybridisierungskurven, die eindeutig von derjenigen des malignen Melanoms abweichen. Das bedeutet, daß Basaliome und maligne Melanome unterschiedlichen, histogenetischen Ursprungs sind und Naevuszellen nicht länger mehr als Vorstufe zur malignen Entartung aufgefaßt werden können.

8. Literaturverzeichnis

- 1 Axel, R., Gulati, S. C., Spiegelman, S.: Particles containing RNA-instructed DNA polymerase and virus related RNA in human breast cancers. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 3133-3137 (1972).
- 2 Axel, R., Schlom, J. and Spiegelman, S.: Presence in human breast cancer of RNA homologous to mouse mammary tumor virus RNA. Nature 235, 32 (1972).
- 3 Balda, B.-R.: Zur Molekularbiologie des Hamstermelanoms A Mel3, einem möglichen Modell für das menschliche Melanom. Habilitationsschrift Universität München (1971).
- 4 Balda, B.-R.: RNS-Viren aus onkogenetischer Sicht. Der Praktische Arzt 11, 2328-2331 (1976).
- 5 Balda, B.-R., Birkmayer, G. D.: Zur Hemmwirkung von Proflavin auf den Einbau von DNS-, RNS- und Proteinvorstufen im Hamstermelanom. Arch. Derm. Forsch. 243, 107-113 (1972).
- 6 Balda, B.-R., Birkmayer, G. D.: Further evidence for viral etiology of human melanoma. Die Naturwissenschaften 60, 304 (1973).
- 7 Balda, B.-R., Birkmayer, G. D. and Braun-Falco, O.: Particle-Associated RNA-Directed DNA Polymerase and 70S RNA in the Hamster Melanoma A Mel3. Arch. Derm. Forsch. 248, 229-236 (1973).
- 8 Balda, B.-R., Hehlmann, R., Cho, J.-R., Spiegelman, S.: Oncorna-virus-like particles in human skin cancers. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3697-3700 (1975).
- 9 Balda, B.-R., Wolff, H. H., Birkmayer, G. D., Braun-Falco, O.: Virus-like particles in the hamster melanoma A Mel3 of Fortner. Die Naturwissenschaften 57, 548 (1970).
- 10 Baltimore, D.: RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumor viruses. Nature 226, 1209-1211 (1970).

- 11 Bauer, G.: RNA-Tumoviren. Naturwissenschaftliche Rundschau 31, Heft 11, 445-455 (1978).
- 12 Baxt, W., Hehlmann, R., Spiegelman, S.: Human leukemic cells contain reverse transcriptase associated with a high molecular weight virus-related RNA. Nature New Biology 240, No 98, 72-75 (1972).
- 13 Bernard, C., Chuat, J. C. and Olivie, M.: Search for endogenous C-type viruses in cultures of non leukemic human cells. Biomedicine 29, 143-146 (1978).
- 14 Bernadi, G.: Chromatography of nucleic acids on hydroxyapatite columns. Procedures in Nucleic Acid Research, vol 2, 455-497 (1971).
- 15 Bernhard, W.: The detection and study of tumor viruses with the electron microscope. Cancer Res. 20, 712-727 (1960).
- 16 Bierwolf, D.: Viren - Das geborgte Leben. 112-118 (1974).
- 17 Birmayer, G.D., Balda, B.-R.: Proflavine Inhibition of Protein Synthesis in Malignant Hamster Melanoma. Febs Letters 11, No 3 (1970).
- 18 Birmayer, G.D., Balda, B.-R., Miller, F.: The inhibitory effect of proflavine and ethidiumbromide on the cell-free transmission and the growth of the hamster melanoma A Me13. Europ. J. Cancer 9, 859-864 (1973).
- 19 Birmayer, G.D., Balda, B.-R., Miller, F.: Oncorna-viral information in human melanoma. Europ. J. Cancer 10, 419-424 (1974).
- 20 Birmayer, G.D., Balda, B.-R., Miller, F., Braun-Falco, O.: Virus-like particles in metastases of human malignant melanoma. Die Naturwissenschaften 59, 369 (1972).
- 21 Bittner, J.J.: Some possible effects of nursing on mammary gland tumor incidence in mice. Science 84, 162 (1936).

- 22 Britten, R.J., Graham, D.E., Neufeld, B.R.: Analysis of repeating DNA sequences by reassociation. *Meth. enzymol.* XXIX, 363-418 (1974).
- 23 Britten, R.J., Kohne, D.E.: Repeated sequences in DNA. *Science* 161, 529-540 (1968).
- 24 Cuatrecasas, W., Cho, J.-R., Spiegelman, S.: Evidence of particle-associated RNA-directed DNA polymerase and high molecular weight RNA in human gastrointestinal and lung malignancies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 3304-3308 (1974).
- 25 Dalton, A.J.: Micromorphology of murine tumor viruses and of affected cells. *Fed. Proc.* 21, 936-941 (1962).
- 26 Dalton, A.J., Haguenau, F.: Ultrastructure of Animal Viruses and Bacteriophages: An Atlas. Chapter 15, 16, 283-311 (1973).
- 27 Duesberg, P.H., Vogt, P.K.: Differences between the ribonucleic acids of transforming and nontransforming evian tumor viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 67, 1673-1680 (1970).
- 28 Ellerman, V., Bang, O.: *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.* 46, 595 (1908).
- 29 Epstein, W.L., Fukuyama, K., Benn, M., Keston, A.S., Brandt, R.B.: Transmission of a pigmented melanoma in golden hamster by a cell-free ultrafiltrate. *Nature (Lond.)* 219, 979-980 (1968).
- 30 Fine, D., Schochetman, G.: Type D Primate Retroviruses: A Review. *Cancer Research* 38, 3123-3139 (1978).
- 31 Gallo, R.C.: Viruses and the Pathogenesis of Human Leukemia. *Schweiz. med. Wschr.* 107, 1436-1440 (1977).
- 32 Gelderblom, H., Bauer, H., Ogura, H., Wigand, R., and Fischer, A.-B.: Detection of Oncornavirus-like Particles in HeLa Cells I. Fine Structure and Comparative Morphological Classification. *Intern. J. Cancer* 13, 246-253 (1974).

- 33 Gillespie, D., Gallo, R.C.: RNA processing and the origin and evolution of RNA tumor viruses: RNA tumor viruses may originate from cell DNA through an alternative mode of RNA processing (para-processing). *Science* 188, 802-805 (1975).
- 34 Gross, L.: Viral Etiology of Cancer and Leukemia: A Look into the Past, Present, and Future - G.H.A. Clowes Memorial Lecture. *Cancer Research* 38, 485-493 (1978).
- 35 Hehlmann, R., Balda, B.-R., Cho, J.R., Spiegelman, S.: RNS-Tumor-virus-ähnliche Partikel in menschlichen Melanomen mit spezifischen Beziehungen zu einem Mäusemelanomvirus. *Verh. dtsch. Ges. inn. Med.* 81, 1576-1580 (1975).
- 36 Hehlmann, R., Balda, B.-R., Spiegelman, S.: Murine and human melanomas containing a high molecular weight RNA associated with an RNA instructed DNA polymerase. *Int. J. Derm.* 17, 114-122 (1978a).
- 37 Hehlmann, R., Balda, B.-R., Spiegelman, S.: Particles from mouse melanoma B16 containing reverse transcriptase and 70S RNA related to human melanoma cytoplasmic RNA. *Arch. dermatol. Res.* 262, 157-165 (1978b).
- 38 Hehlmann, R., Erfle, V.: Biochemical studies on RNA tumor virus information and its transmission in B16 murine melanoma. *Int. J. Cancer* 22, 630-638 (1978).
- 39 Hehlmann, R., Kufe, D., Spiegelman, S.: RNA in human leukemic cells related to the RNA of a mouse leukemia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash.)* 69, 435-439 (1972).
- 40 Huebner, R.J., Todaro, G.J.: Oncogenes of RNA tumor viruses as determinants of cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 64, 1087-1094 (1969).
- 41 Klein, P.A., Smith, R.T.: The role of oncogenic viruses in neoplasia. *Ann. Rev. Med.* 28, 311-327 (1977).

- 42 Kohne, D.E.: Evolution of higher-organism DNA. Quarterly Reviews of Biophysics 33, 327-375 (1970).
- 43 Kohne, D.E., Britten, R.J.: Hydroxyapatite techniques for nucleoid acid reassociation. Procedures in Nucleic Acid Research, vol 2, 500-512 (1971).
- 44 Marmur, J., Rownd, R., Schildkraut, C.L.: Denaturation and renaturation of DNA. Progr. Nucleic Acid Res. 1, 231 (1963).
- 45 Muschol, A., Speer, U.: Medizinische Mikrobiologie. 1, (1978).
- 46 Parsons, P.G., Gross, P., Pope, J.H.: Detection in human melanoma cell lines of particles with some properties in common with RNA tumor viruses. Int. J. Cancer 13, 606-618 (1974).
- 47 Parsons, P.G., Klucis, E., Gross, P.D., Pope, J.H., Little, J.H., Davis, N.C.: Oncorna-virus like particles in malignant melanoma and control biopsies. Int. J. Cancer 18, 757-763 (1976).
- 48 Rous, P.: A transmissible avian neoplasm (sarcoma of the common fowl). J. Exp. Med. 12, 695 (1910).
- 49 Rous, P.: A sarcoma of the fowl transmission by an agent separable from the tumor cells. J. Exp. Med. 13, 397-411 (435) (1911).
- 50 Schlom, J., Spiegelman, S.: Simultaneous detection of reverse transcriptase and high molecular weight RNA unique to the oncogenic RNA viruses. Science 174, 840-843 (1971).
- 51 Schulz, H.: Virustumoren. Deutsche Medizinische Wochenschrift 95, Nr. 25, 1367-1371 (1970).
- 52 Temin, H.M.: Nature of the provirus of Rous sarcoma. Natl. Cancer Inst. Monogr. 17, 557-570 (1964).
- 53 Temin, H.M.: The provirus hypothesis: Speculations on the significance of RNA-directed DNA synthesis for normal development and

- for carcinogene. J. Natl. Cancer Inst. 46, III-VII (1971).
- 54 Temin, H.M.: The RNA Tumor Viruses - Background and Foreground. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 69, 1016-1020 (1972).
- 55 Temin, H.M.: RNS-gesteuerte DNS-Synthese und ihre Bedeutung für die Medizin. Triangel Band 11, Nr. 2, 37-42 (1972).
- 56 Temin, H.M., Mizutani, S.: RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. Nature 226, 1211-1213 (1970).
- 57 Todaro, G.J.: RNA-Tumor-Viruses Genes and Transforming Genes: Patterns of Transmission. Br. J. Cancer 37, 139-158 (1978).
- 58 Vigne, R., Neil, J.C., Breitman, M.L., Mascovici, C., and Vogt, P.K.: Genetic variation and host markers in the src gene of several avian sarcoma viruses. In: P. Palese and B. Roizman (ed): Genetic variation of viruses. Ann. New York Acad. Sci. 354, 384-397 (1980).
- 59 Vogt, P.K.: The emerging genetics of RNA tumor viruses. Guest Editorial. Journal of the national cancer institute 48, No 1, 3-9 (1972).
- 60 Watson, J.D.: Molecular Biology of the Gene. 641-688 (1976).
- 61 Wetmur, J.G., Davidson, N.: Kinetics of renaturation of DNA. Mol. Biol. 31, 349-370 (1968).
- 62 Wiesmann, E.: Medizinische Mikrobiologie. 3, 133 (1978).
- 63 Wolff, H.H., Balda, B.-R., Birkmayer, G.D., Braun-Falco, O.: Zur Ultrastruktur des Hamster-Melanoms A Mel3 von Fortner. Arch. Derm. Forsch. 240, 192-203 (1971).

Herrn Prof. Dr. B.-R. Balda danke ich für die Überlassung des Themas und die Arbeitsmöglichkeit an der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Universität München.

Mein Dank gilt auch Frau Scola und Fräulein Schröder für ihre Betreuung während der Laborarbeit.

## Lebenslauf

Am 1. September 1956 wurde ich als Tochter der Eheleute Alfred und Elisabeth Forster, geb. Scheuing, in Immenstadt (Allgäu) geboren.

Ich besuchte von 1963 bis 1967 die Volksschule in Immenstadt. Im September 1967 trat ich in das Neusprachliche Gymnasium Maria Stern Immenstadt, 1973 in das Neusprachliche Gymnasium Oberstdorf ein. Dort legte ich im Jahre 1976 die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1976/77 nahm ich das Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München auf.

Im Oktober 1981 begann ich das Praktische Jahr mit Wahlfach Pädiatrie.

Nach Bestehen des 3. Abschnitts der Ärztlichen Prüfung im November 1982 erhielt ich am 26. November 1982 die Approbation als Arzt.



